



Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Ciencias

**FUNCIÓN DE SOX5 EN LA
REGIONALIZACIÓN DEL TUBO NEURAL
DE VERTEBRADOS**

Memoria de Tesis Doctoral

Alejandra Quiroga del Río

Enero 2013



Universidad Autónoma De Madrid

Facultad De Ciencias

Departamento de Biología Molecular

**Función de Sox5 en la regionalización del
tubo neural de vertebrados**

Memoria de Tesis Doctoral

presentada por

Alejandra Quiroga del Río

**para optar al grado de Doctora en Biología Molecular
por la Universidad Autónoma de Madrid,**

Directora de tesis:

Dra. Victoria Aixa Morales García, Instituto Cajal, CSIC

Tutor Académico:

Dr. Francisco Zafra, Universidad Autónoma de Madrid

Madrid, Enero de 2013

**Esta tesis ha sido realizada gracias a la concesión de
una beca Jae-Pre 2008 (CSIC)**

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría empezar esta tesis dando las gracias a todos aquellos que durante estos años han contribuido, directa o indirectamente, a que este proyecto pudiera realizarse. Ha participado en ello mucha gente, así que si me dejo a alguien espero me disculpe.

En primer lugar quiero agradecer a Aixa y a Julio por darme la oportunidad de embarcarme en esta aventura, por confiar en mí para poner en marcha nuevos proyectos y enseñarme a luchar para terminarlos.

Asimismo, debo dar las gracias a Ruth por su ayuda en el laboratorio, sugerencias e ideas que han ayudado a dar forma a esta tesis. En este mismo sentido agradezco a Paola todo el apoyo brindado durante el desarrollo de esta tesis, tanto material como intelectual, con discusiones, ayuda en el planteamiento de nuevos experimentos y una visión global del proceso, que han sido de gran importancia.

Por supuesto debo agradecer a todos aquellos que han formado parte del laboratorio A19-MA01 durante estos años. A Bea Lázaro que me introdujo en el maravilloso mundo del criostato y me ayudó con los embriones de ratón y a Bea Soldevilla por su aporte de energía y buen humor en el laboratorio. Por supuesto a Ainhoa, por ser una técnica inmejorable y hacer que mi trabajo fuera mucho más fácil. Además, merece un agradecimiento especial Paty, por enseñarme todo lo que hay que saber del trabajo en el laboratorio, porque discutir las cosas con ella siempre hacía que encontráramos solución a todo y, sobre todo, por haberme permitido conocer a la gran persona que hay más allá de la buena científica y haber sido tan buena amiga a lo largo de estos años.

A todos los miembros del MA01, presentes y pasados, porque todos han contribuido de una forma u otra a esta tesis y son un poquito de ella. Así que debo dar las gracias a Pilar por su ayuda con las células y la discusión de experimentos, a Cristina, Elsa, Severine, Lara, Luis, Inma, Marcos y Afri por su apoyo en cuestiones de laboratorio, informáticas y tantos momentos agradables en el laboratorio. A Ivan y Chema por ayudarme en los inicios de la aventura con los medaka y no cansarse de mis preguntas. A Raquel por su paciencia infinita para enseñarme a microinyectar, por su interés constante por el proyecto y por su buen humor, incluso cuando limpiábamos peceras. En este apartado de los peces por supuesto tengo que agradecer a Leo, por toda su ayuda en el planteamiento y desarrollo de experimentos, por ser muy buena compañía de fin semana, hacerme favores a horas inverosímiles, por su ayuda informática y por ser un gran compañero. También he de agradecer a Isidro y Noemí su gran trabajo en el mantenimiento de los peces. A Maku, por sus enseñanzas de estadística, su apoyo y ser una gran compañera de congresos. A Kurro por su gusto por la polémica que siempre nos entretenía y por el té de las cinco, que nos mantenía en pie el resto de la tarde.

Tengo que agradecer también a los que han pasado por el laboratorio en nuestra segunda etapa de grupo pequeño. A Sergio, por estar pendiente de mí incluso una vez que se ha ido y por darme la oportunidad de embarcarme en sus proyectos de divulgación. A Spas por todo lo que me enseñó de la ciencia y la cultura fuera de España. A Luis por compartir conmigo su impecable técnica histológica del criostato, por los helados y los buenos ratos en el laboratorio. A Verónica, Óscar y MariCarmen por su ayuda técnica.

A toda la gente que ha pasado durante estos años por el Cajal agradezco sus

conversaciones en los pasillos y haberme ayudado en uno u otro momento: Yoryiani, Marion, Paloma, Elena, Asun, Natalia, Sheila, Miriam, Edu y Sandra. A Anita, por la terapia de grupo y la competición entre la peor PCR y la peor *in situ* de la historia. A Gema y Eli, por las buenas sobremesas y haberse convertido en amigas. A Julia por sus grandes crónicas de viajes, sus postres y haberme acogido en su laboratorio sin reservas. A María, compañera y amiga de clase de alemán, por darme la oportunidad de aprender con ella y enseñarme a superar las fases de escritura de la tesis. Esto me lleva a agradecer también a Luis, mi profesor de alemán, por toda su paciencia cuando no estudio o me atasco, y porque sin su ayuda no habría podido sobrevivir en Alemania.

Al Servicio de Biología Molecular y Celular y en especial a Jazz y a Silvia por su asesoramiento en el uso de los aparatos comunes, por dejarme usar todos los que he necesitado y por su ayuda con las midis. Al Servicio de Microscopía Confocal y Análisis de Imagen y, sobre todo, a Carmen. Por ayudarme a llevar a cabo hasta la idea más peregrina que se me ha ocurrido, por buscarme siempre un hueco en el confocal para fotos de emergencia y por hacer tan entretenidas las tardes de los viernes. A todos aquellos grupos del Cajal que en algún momento me han dejado reactivos o material, en especial a laboratorio de Alberto Ferrús por las enzimas y anticuerpos y al laboratorio de José María Frade por los huevos y anticuerpos. A los vigilantes que me ayudaron a meter los huevos en el incubador a altas horas de la noche.

A todos los miembros del laboratorio de Michael Wegner en Erlangen que hicieron de mi estancia allí un período inolvidable. Fundamentalmente a Michael por acogerme y por poner a mi disposición su laboratorio durante los meses que pasé allí, y por su inmensa ayuda con el diseño de experimentos y la discusión de los mismos. A Elli por preocuparse tanto por mí, no sólo en el laboratorio sino fuera de él, por enseñarme a hacer EMSAs, ayudarme con los *westerns*, buscarme un médico y enseñarme alemán. A Claus por buscar siempre un momento para atenderme sin importar lo ocupado que estuviera, por enseñarme tantas cosas del trabajo de laboratorio y estar siempre dispuesto a buscar soluciones y discutir resultados. A Melli, por enseñarme a hacer las ChIPs y un montón de cosas de la cultura alemana. A Simone, Franzi, Magda y Matthias por integrarme en la vida del laboratorio, y fuera de ella ayudarme con las cuestiones cotidianas que en otro idioma se hacen tan difíciles.

Fuera de los laboratorios tengo que agradecer a mis amigos. A Adelaida, por haberme aguantado durante tantos años y seguir teniendo paciencia conmigo, recomendarme libros y música, y estar dispuesta a ayudarme con los aspectos de forma de la tesis. A mis amigos de la carrera, a Salva porque sólo con él puedo discutir sobre mis experimentos y porque nos hemos hecho mayores juntos y hemos aprendido muchas cosas desde que comíamos en el césped en la carrera. A Araceli, por estar pendiente de mí y cuidarme. A Javi, porque sin sus historias del Jardín nuestra vida sería mucho más aburrida. A Laura por estar siempre dispuesta a recorrerse media Comunidad de Madrid para quedar con nosotros y apoyarnos en lo que haga falta. A David por todos esos viajes que hemos hecho juntos y lo que hemos aprendido de ellos, por las vacaciones de descanso en Huelva y por estar siempre en contacto. A Belén, por todos los buenos consejos y lo que me ha enseñado a lo largo de estos años, por los buenos momentos y porque sin sus chistes malos hacer esta tesis hubiera sido mucho más duro. A Lali, por su buen humor y optimismo, y por encontrar siempre solución a todo, y a Alberto por ser nuestro contacto con la realidad y por sus historias surrealistas.

A Mario, por su ayuda y paciencia constantes e infinitas. Por tener más confianza en mí que yo misma.

A mi familia extendida: Rosa, Mercedes y Mariví. Por llevarme a recorrer el mundo y haberme enseñado tantas cosas que necesitaría otra tesis para contarlas. Porque si algún día llego a saber una mínima parte de lo que sabéis vosotras me daré por satisfecha.

Por último quiero agradecer a mi familia. A mis padres por su apoyo y ayuda logística e intelectual, y por haberme incitado siempre a satisfacer mi curiosidad y haberme enseñado la importancia de la cultura. A mi hermana, por ser el sentido común de la familia y mantener los pies en el suelo, y por enseñarnos a todos que a veces la explicación más simple es la correcta. Al resto de mi familia por confiar tanto en mí. Y al abuelo, porque siempre se interesó por lo que hacía y me apoyó, y porque quiero pensar que esta tesis le hubiera gustado.

ÍNDICE

ABREVIATURAS 15

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS 23

SUMMARY 27

INTRODUCCIÓN

- 1. El desarrollo del sistema nervioso 33**
- 2. Establecimiento del patrón dorso-ventral 35**
 - 2.1 La formación del patrón ventral y la vía de Shh 36
 - 2.2 Vías de señalización implicadas en la formación del patrón dorsal 38
 - 2.2.1 La vía de Wnt 38
 - 2.2.2 Interacción entre las vías de Wnt y Shh en el establecimiento del patrón D-V 41
 - 2.2.3 La vía de TGF- β 42
- 3. Control de la proliferación en la médula espinal 43**
- 4. La familia de genes Sox 44**
 - 4.1 Análisis filogenético y estructural 44
 - 4.2 Interacción de los factores Sox con otras proteínas 46
 - 4.3 Grupo de factores SoxD 47
 - 4.4 Interacción de las proteínas Sox con la vía de Wnt 48
- 5. Los genes Sox durante el desarrollo del sistema nervioso 49**
 - 5.1 Sox5 y Sox6 en oligodendrogénesis 50
 - 5.2 Sox5 en la especificación de la cresta neural 51
 - 5.3 Sox5 y Sox6 en el desarrollo de la corteza 51
 - 5.4 Sox5 en el control de la proliferación en la médula espinal 52

OBJETIVOS 55

MATERIAL Y MÉTODOS 59

1. Animales 61

1.1 Embriones de pollo 61

1.2 Embriones de pez medaka 61

1.3 Embriones de ratón 61

2. Construcciones y oligonucleótidos utilizados 61

2.1 Microinyección en pez medaka 61

2.1.1 Sobre-expresión de Sox5 61

2.1.2 Morfolinos 65

2.1.3 Construcción control de la actividad bloqueante de los morfolinos 65

2.2 Electroporación en embriones de pollo 65

2.2.1 Sobre-expresión de Sox5 65

2.2.2 Bloqueo de la expresión de Sox5 65

2.2.3 Sobre-expresión de β -catenina 66

2.2.4 Rescate de muerte celular 66

2.2.5 Ensayos de actividad luciferasa 66

3. Microinyección en embriones de pez medaka 67

4. Electroporación *in ovo* 68

5. Ensayos de actividad transcripcional con luciferasa 68

6. Hibridación *in situ* en embriones completos 69

6.1 Embriones de pollo y ratón 69

6.2 Embriones de pez medaka 70

7. Inmunohistoquímica 70

8. Western blot 72

8.1 Western blot de embriones de pez medaka 72

8.2 Western blot de embriones de pollo 72

9. Coinmunoprecipitación (CoIP) 72

9.1 Transfección en cultivos de líneas celulares 72

9.2 Coinmunoprecipitación 73

11. Ensayo de movilidad electroforética (EMSA) 73

11.1 Transfección y preparación de extractos celulares 73

11.2 Hibridación de los oligonucleótidos 74

11.3 Marcaje de los oligonucleótidos con 32P-CTP 74

11.4 Electroforesis 74

12. Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) 74

12.1 Transfección 74

12.2 ChIP 74

RESULTADOS 79

1. Análisis de la expresión de Sox5 en tres modelos de vertebrados 81

1.1 Sox5 se expresa de manera regionalizada en los progenitores del tubo neural de pollo 83

1.2 Sox5 se expresa en progenitores del tubo neural en embriones de ratón 85

1.3 Sox5 se expresa en la cresta neural y en los progenitores en embriones de pez medaka 86

2. Expresión de Sox6 en el tubo neural en embriones de pollo y ratón 88

3. La expresión ectópica de Sox5 altera la identidad de los progenitores dorsales 90

4. Sox5 es necesario para la correcta especificación de los progenitores dorsales 92
5. Sox5 participa en la diferenciación de las interneuronas dorsales 96
6. Sox5 controla la especificación de los progenitores dorsales modulando la vía de Wnt 101
 - 6.1. Sox5 reduce la actividad de la vía canónica de Wnt 101
 - 6.2. Sox5 interacciona directamente con β -catenina 103
 - 6.3. Sox5 es necesario para la expresión de *Axina2* 105
 - 6.4. Sox5 se une a trece sitios conservados de las regiones reguladoras de *Axina2* 106
 - 6.5. Sox5 participa en la regulación transcripcional de *Axina2* 108
 - 6.6. Sox5 se une *in vivo* a los sitios T6/T13 en el primer intrón de *Axina2* 109
 - 6.7. El mutante puntual Sox5^{M569I} tiene actividad dominante negativa 110
7. Papel de Sox5 en la generación del patrón dorso-ventral en embriones de pez medaka 111
 - 7.1 La sobre-expresión de Sox5 provoca un incremento de las interneuronas dorsales dl3 114
 - 7.2 Experimentos de falta de función 117
8. Papel de Sox5 en la especificación del patrón ventral en el tubo neural 118

DISCUSIÓN 123

1. Sox5 está implicado en la regionalización dorsal del tubo neural 125
2. Sox5 interacciona con la vía de Wnt en la región dorsal del tubo neural 129

3. Mecanismos moleculares de interacción de Sox5 con la vía de Wnt 130
4. La forma mutante Sox5^{M569I} actúa como dominante negativo 133
5. Papel de Sox5 en la generación del patrón ventral de la médula espinal 134
6. Generación del patrón D-V en embriones de pez medaka 135

CONCLUSIONES 139

BIBLIOGRAFÍA 143

ANEXOS 159

Anexo 1. Tabla resumen de las funciones de los factores Sox 163

Anexo 2. Artículos publicados 165

1. Martínez-Morales, L. P., Quiroga, A. C., Barbas, J. A. & Morales, A. V. SOX5 controls cell cycle progression in neural progenitors by interfering with the WNT- β -catenin pathway. *EMBO reports*, 11:466-472 (2010)
2. Martínez-Morales, L. P., Díez del Corral, R., Olivera-Martínez, I., Quiroga, A. C., Das, R. M., Barbas, J. A., Storey, K. G. & Morales, A. V. FGF and RA activity gradients control the timing of neural crest cell emigration in the trunk. *Journal of Cell Biology*, 194 (3):489-503 (2011)
3. Quiroga, A. C., Stolt, C. C., Pérez-Alcalá, S., Sock, E., Barbas, J. A., Wegner, M. & Morales, A. V. Sox5 counteracts Wnt-promoted dorsal identity in the neural tube through the transcription of *Axin2*. (Enviado a *Development*)

Abreviaturas

Abreviatura	Nombre completo
aa	Aminoácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
A-P	Antero-posterior
APC	<i>Adenomatous poliposis coli</i>
AR	Ácido retinoico
ARNi	Ácido ribonucleico interferente
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
BCIP	<i>5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, toluidine salt</i>
bHLH	Hélice-bucle-hélice (<i>basic helix-loop-helix</i>)
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BMPRs	Receptores de BMP (<i>bone morphogenetic protein receptors</i>)
BSA	Albúmina sérica bovina (<i>bovine serum albumin</i>)
Cash	<i>Chicken Athonal Acheate-Scute Homologue</i>
cc	Dominio <i>colied-coil</i>
CCN	Células de cresta neural
ChIP	Inmunoprecipitación de cromatina (<i>Chromatin immunoprecipitation</i>)
CKI	Caseína quinasa I
CoIP	Coinmunoprecipitación
Co-Smad	<i>Common-mediator Smad</i>
cpm	Cuentas por minuto
dl	Interneuronas dorsales
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
dp	Progenitores dorsales
dpc	Días de gestación
Dsh	Dishevelled
DTT	Dithiothreitol
D-V	Dorso-ventral
EGFP	Proteína Verde Fluorescente (<i>Enhanced green fluorescent protein</i>)
EMSA	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i>
FCS	Suero fetal de ternera (<i>Fetal calf serum</i>)
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
Fig.	Figura

Fz	Frizzled
GSK3	<i>Glycogen synthase kinase 3</i>
HD	Homeodominio
HDAC	Histonadesacetilasa
HEK	<i>Human embrionic kidney cells</i>
HH	Hamburger y Hamilton
HMG	<i>High Mobility Group</i>
IH	Inmunohistoquímica
INT	<i>2-[4-iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazolium chloride</i>
IP	Inmunoprecipitación
ISH	Hibridación <i>in situ</i>
LRP	<i>Low density lipoprotein receptor-related protein</i>
Mash	<i>Mouse Athonal Acheate-Scute homologue</i>
MBP	Proteína de unión a la mielina
MN	Motoneuronas
Mo	Morfolino
MPS	Mesodermo Presomitico
MPZ	Proteína cero de la mielina
N	Notocorda
NBT	<i>Nitro blue tetrazolium chloride/5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphate</i>
Ngn	Neurogenina
pb	Pares de bases
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBT	PBS + 1% Tritón X100
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PE	Post-electroporación
PEI	Polietilenamina
PFA	Paraformaldehído
PH3	Fosfo-histona 3
PKA	Proteína quinasa A
PS	Placa del suelo
PT	Placa del techo
Ptc	Patch
PTW	PBS + 1% Tween 20

PVDF	Polivinildenedifloride
RFP	Proteína roja fluorescente (<i>Red fluorescent protein</i>)
rpm	Revoluciones por minuto
SDC	<i>Deoxycholic acid sodium salt</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SFPE	<i>Shh floor plate enhancer</i>
SFRPs	<i>Secreted frizzled related proteins</i>
shARN	<i>Short hairpin</i> ARN
Shh	Sonic hedgehog
Smo	Smoothened
SN	Sistema nervioso
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
Sox	<i>Sry-related HMG box</i>
TGFβ	<i>Transforming growth factor β</i>
tk	Tirosín quinasa
UTR	Región sin traducción (<i>Untranslated region</i>)
v	Interneuronas ventrales
V-D	Ventro-dorsal
vp	Progenitores ventrales
WIF	Proteínas inhibitorias de Wnt
Wnt	<i>Wingless-type</i>
ZM	Zona del manto
ZV	Zona ventricular

Índice de figuras y tablas

I. FIGURAS

- Fig. 1. Formación del tubo neural, señales implicadas y generación del patrón dorso-ventral **34**
- Fig. 2. Vía de señalización de Shh y generación del patrón ventral **37**
- Fig. 3. Vías de señalización implicadas en la generación del patrón dorsal en la médula espinal **39**
- Fig. 4. Estructura y clasificación de los genes Sox **45**
- Fig. 5. Actividad transcripcional de las proteínas Sox **46**
- Fig. 6. Microinyección en embriones de pez medaka **67**
- Fig. 7. Experimentos de electroporación en el tubo neural de embriones de pollo **68**
- Fig. 8. La organización de los dominios de la proteína Sox5 se encuentra conservada en medaka, pollo y ratón **82**
- Fig. 9. Esquema del tubo neural **83**
- Fig. 10. Sox5 se expresa en dominios específicos de los progenitores dorsales en embriones de pollo **84**
- Fig. 11. Sox5 se expresa en los progenitores dorsales en embriones de ratón **85**
- Fig. 12. Sox5 se expresa en la zona ventricular en embriones de pez medaka **87**
- Fig. 13. Sox6 se expresa en los progenitores dorsales en embriones de pollo y ratón **89**
- Fig. 14. La expresión ectópica de Sox5 altera la identidad de los progenitores dorsales **91**
- Fig. 15. La expresión de Sox5 es necesaria para que se especifiquen correctamente los progenitores dorsales **93**
- Fig. 16. Alteraciones en las poblaciones de progenitores e interneuronas en embriones con exceso y falta de función de Sox5 **94**
- Fig. 17. La expresión de Sox5 es necesaria para la especificación de las interneuronas dorsales **95**
- Fig. 18. La expresión de Sox5 en etapas tempranas de desarrollo es necesaria para que se especifiquen las interneuronas dorsales **98**
- Fig. 19. La reducción de Sox5 en etapas tempranas provoca la muerte de las interneuronas **100**
- Fig. 20. Sox5 reduce la actividad vía de Wnt en la región dorsal del tubo neural **102**
- Fig. 21. Sox5 interacciona con β -catenina **104**
- Fig. 22. La unión de Sox5 a un sitio conservado en el primer intrón de *Axina2* es necesaria para la activación cooperativa de Sox5 y β -catenina de *Axina2* **107**

Fig. 23. El mutante Sox5^{M569I} se une al ADN con poca afinidad y no potencia la transcripción de *Axina2* **110**

Fig. 24. Representación esquemática de las proteínas Sox5 de pollo, ratón, pez medaka y pez cebra **111**

Fig. 25. Análisis de marcadores de diferentes poblaciones de progenitores y neuronas diferenciadas en embriones de pez medaka **112**

Fig. 26. La expresión ectópica de Sox5 en embriones de pez medaka no causa alteraciones morfológicas evidentes **113**

Fig. 27. El exceso de función de Sox5 produce alteraciones en la especificación de las interneuronas **115**

Fig. 28. El uso de morfolinós en embriones de pez medaka no causa alteraciones morfológicas ni de los marcadores de progenitores y neuronas analizados **116**

Fig. 29. Análisis de la actividad de la región reguladora SFPE1 de Shh **119**

Fig. 30. Esquema de los efectos del exceso y falta de función de la vía de Wnt en el tubo neural **129**

Fig. 31. Modelo de la interacción de Sox5 con la vía de Wnt **132**

II. TABLAS

Tabla 1. Resumen de la interacción de los factores de transcripción Sox con otras proteínas **48**

Tabla 2. Lista de oligonucleótidos utilizados **62**

Tabla 3. Lista de anticuerpos utilizados **71**

Tabla 4. Funciones de los genes Sox **163**

Summary

During the development of the central nervous system, a large number of different neurons and glial cells are generated from a small population of self-renewing cells. In the neural tube, progenitors are located in the medial ventricular zone and they migrate laterally to the mantle zone upon exiting the cell cycle, a site where differentiating, post-mitotic cells accumulate. Distinct neuronal subtypes emerge from progenitor cells in a precise spatial order, partitioning the dorsoventral axis of the neural tube into discrete regions that are occupied by different neural precursors and neuronal subtypes. The correct coordination of these events requires high spatio-temporal control. The HMG-box transcription factors of the Sox gene family could be at the core of those processes, as they have regulatory functions during neurogenesis in the vertebrate central nervous system. In fact, previous studies in the laboratory have established that Sox5 controls the timing of cell cycle exit of neural precursors at the G1/S transition, by counteracting the mitotic effect of the Wnt/ β -catenin pathway. In the dorsal neural tube, Wnt canonical pathway, acting through the Tcf/ β -catenin transcription complex, also controls the specification of dorsal progenitors and interneurons. In this study, we have described that in chick embryos Sox5 is expressed dynamically in spatially restricted neural precursors in the spinal cord. Furthermore, Sox5 is expressed in a very similar pattern in mouse and medaka fish embryos. Using gain and loss of function analysis, we have determined that Sox5 controls cell fate specification of dorsal neural progenitors by inducing the transcription of the negative Wnt pathway regulator *Axin2*. We have established that Sox5 promotes *Axin2* transcription together with Tcf/ β -catenin through direct binding to a conserved binding site present in *Axin2* first intron. By that way, Sox5 could limit the extent of dorsal identity imposed by Wnt signaling in the central nervous system. In conclusion, Sox5 coordinates proliferation and dorsal patterning during the development of the spinal cord.

Introducción

1. El desarrollo del sistema nervioso

Incluso en los organismos más simples el sistema nervioso (SN) está formado por varios centenares de células nerviosas. A medida que aumenta la complejidad de los organismos el número y la diversidad de las células nerviosas crece enormemente. Esta especialización permite la diferenciación de un sistema nervioso periférico (SNP) formado por neuronas sensoriales encargadas de recibir los estímulos tanto internos como externos, y las neuronas y glía que los dirigirán hacia el sistema nervioso central (SNC), donde se integrarán y generarán las respuestas correspondientes. Para que todo este sistema de gestión de la información sea funcional, es necesario que existan mecanismos que permitan la especificación correcta, tanto en el espacio como en el tiempo, de todos los tipos celulares.

La formación del SN de vertebrados requiere de la producción ordenada espacial y temporalmente de un gran número de neuronas y glía a partir de una población relativamente pequeña de progenitores mitóticamente activos. El SN da lugar a distintas estructuras a lo largo del eje antero-posterior (A-P); en la zona rostral se origina el encéfalo (prosencefalo, mesencefalo y romboencefalo) y la médula espinal en la región caudal. En las regiones más dorsales del tubo neural, a partir del territorio de la cresta neural, se originará el SNP. El desarrollo de la médula espinal, la región antómicamente más simple y conservada del SN de vertebrados, constituye un gran modelo para el estudio de los mecanismos que controlan tanto el establecimiento de patrones ordenados de adquisición de identidad celular como el balance entre la proliferación y la diferenciación de las células que lo forman.

En etapas tempranas de gastrulación, a partir del epiblasto embrionario, se especifica la placa neural gracias a señales procedentes del nodo de Hensen como FGF (*Fibroblast Growth Factor*). La señalización de FGF, es la responsable de atenuar la actividad de BMP (*Bone Morphogenetic Protein*) que promueve la formación del ectodermo no neural (Diez del Corral & Storey, 2004). Es decir, se genera una población de células neurales flanqueadas por células del ectodermo epidérmico. Tras la inducción de la placa neural rostral (que da lugar al cerebro anterior), cuando el nodo de Hensen y la línea primitiva regresan caudalmente, señales procedentes de estas estructuras y del mesodermo recién formado, tales como FGFs, BMPs y el ácido retinoico (AR), inducen la formación y mantenimiento de la placa neural caudal que genera el resto del cerebro y la médula espinal (Diez del Corral & Storey, 2004; Jessell, 2000).

A continuación tiene lugar el proceso de neurulación, que consiste en una serie de movimientos morfogénéticos que culminan con la formación del tubo neural. Existen dos tipos diferentes de neurulación, la primaria y la secundaria. En la neurulación primaria se forma primero una placa neural, a partir del ectodermo, que se plegará y cerrará

progresivamente hacia la línea media hasta dar lugar a un tubo cerrado que finalmente se separará del ectodermo (Fig. 1A; Lawson & Schoenwolf, 2009). Por otra parte, en la neurulación secundaria se forma primero una masa sólida de células mesenquimales que se cavitará progresivamente dando lugar a un epitelio y generando un tubo (Fig. 1B; Lawson & Schoenwolf, 2009). En anfibios, aves, mamíferos y peces el tubo neural se forma inicialmente por neurulación primaria en las zonas anteriores del embrión y, más adelante en el desarrollo y en las zonas más caudales, por neurulación secundaria (Lowery & Sive, 2004).

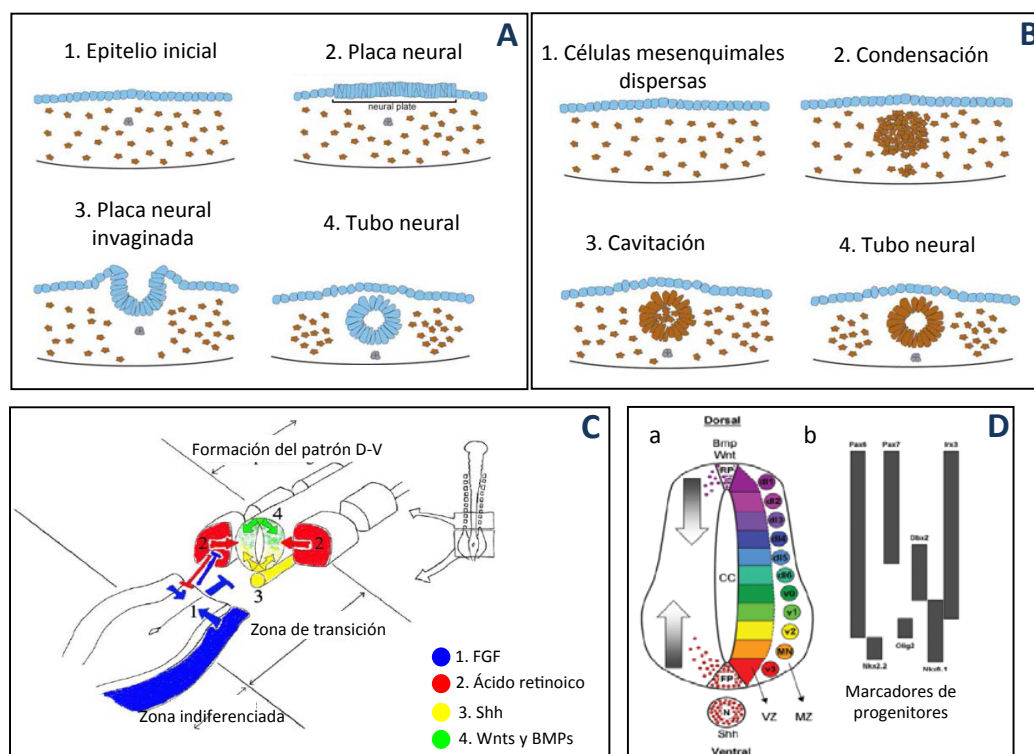


Fig. 1. Formación del tubo neural, señales implicadas y generación del patrón dorso-ventral. Formación del tubo neural por neurulación primaria (A) y secundaria (B). (C) Señales implicadas en la diferenciación neural y en el patrón D-V: FGF procedente del mesodermo presomítico que mantiene las células neuroepiteliales indiferenciadas, el ácido retinoico procedente de los somitas promueve la diferenciación neural, Shh secretado por la placa del suelo y la notocorda controla la proliferación y el establecimiento del patrón ventral y Wnt y BMP secretadas por la placa del techo participan en el balance proliferación/diferenciación y en el establecimiento del patrón dorsal. (C) Patrón D-V en el tubo neural; (a) especificación espacial de los 10 tipos de progenitores de interneuronas y los progenitores de las motoneuronas en la zona ventricular y sus correspondientes neuronas post-mitóticas en la zona del manto; (b) patrones de expresión de algunos de los factores de transcripción que determinan la identidad de los progenitores en el eje D-V. VZ: zona ventricular, MZ: zona del manto. Modificado de: (A y B) (Lowery & Sive, 2004); (C) (Wilson & Maden, 2005) y (D) (Ulloa & Briscoe, 2007).

2. Establecimiento del patrón dorso-ventral

En la zona más caudal del embrión, el tubo neural es un neuroepitelio formado por progenitores neurales multipotentes y proliferativos, gracias a la señalización de la vía de FGF generada en el mesodermo y de señales procedentes del propio tubo neural caudal, como son las de FGF, Wnt y Shh. La diferenciación neural y la adquisición del patrón dorso-ventral (D-V) se realiza de manera progresiva, de forma que la especificación neural tiene lugar en las regiones flanqueadas por los somitas ya formados, fuente de AR, mientras que en las zonas más caudales los progenitores neurales se mantienen indiferenciados debido a que señales del mesodermo presomítico como FGF reprimen la diferenciación (Fig. 1C; Díez del Corral *et al.*, 2003).

En el tubo neural en desarrollo los progenitores mitóticamente activos se localizan en la región ventricular (la más cercana a la luz del tubo). A medida que salen de ciclo, migran lateralmente a la zona del manto en la cual se acumulan las células postmitóticas diferenciadas (Fig. 1D; Fujita, 1964). El balance entre proliferación y diferenciación celular posibilita el crecimiento del tubo neural a la vez que mantiene un nicho de progenitores. Además, los distintos subtipos neuronales se diferencian a partir de sus progenitores en un orden espacial específico, dividiendo el eje D-V del tubo neural en regiones discretas ocupadas por los diferentes precursores neurales y las interneuronas a las que dan lugar (Fig. 1D; Dessaud *et al.*, 2008; Jessell, 2000). Así, a partir de los seis tipos de progenitores dorsales, los cuatro de interneuronas ventrales y los progenitores de las motoneuronas, se especificarán diferentes subtipos de interneuronas procedentes de cada población de progenitores (nueve tipos de interneuronas dorsales, trece de interneuronas ventrales y las motoneuronas; Alaynick *et al.*, 2011) pero, en general, se agrupan en los mismos dominios que los progenitores (Briscoe *et al.*, 2000; Le Dréau & Martí, 2012; Ulloa & Briscoe, 2007). La correcta formación de los distintos tipos de interneuronas durante el desarrollo es de gran importancia, puesto que tendrá un reflejo funcional en los organismos adultos. De esta manera, las neuronas encargadas del procesamiento de la señalización sensorial externa al organismo se concentran en la zona dorsal de la médula espinal, mientras que aquellas implicadas en el control motor se localizan en la región ventral.

Las vías de señalización implicadas en la proliferación celular y en la formación del patrón D-V en el tubo neural han sido ampliamente estudiadas. En ambos casos participan moléculas de señalización comunes (Wnts, BMPs y Shh) pero hay pocos estudios acerca de la coordinación entre ambos procesos durante el desarrollo. Además, tanto los mecanismos celulares que tienen lugar durante la neurogénesis del tubo neural como las vías de señalización que las regulan están altamente conservadas entre pollo, mamíferos y peces (Guner & Karlstrom, 2007; Placzek & Briscoe, 2005).

En el control de la neurogénesis en el tubo neural participan dos centros de señalización que se especifican dentro del propio tubo neural: la placa del techo y la placa del suelo. Estas regiones secretan moléculas difusibles que controlan no sólo el número sino también el tipo de células que se especificarán a lo largo del eje D-V en la médula espinal (Dessaud *et al.*, 2008; Jessell, 2000; Ulloa & Briscoe, 2007). Así, la placa del techo genera un gradiente D-V de BMPs y Wnts mientras que la placa del suelo y la notocorda subyacente producen un gradiente contrario ventro-dorsal (V-D) de Sonic hedgehog (Shh). Tanto Shh como Wnt son morfógenos, es decir, moléculas señalizadoras capaces de actuar a distancia de su fuente de producción y de generar una respuesta diferencial en función de la concentración de morfógeno que éstas reciban. Además, ambos controlan la identidad de los progenitores neurales y de las neuronas diferenciadas del tubo neural.

Cada tipo de progenitor se localiza en una posición específica y está definido por la expresión de un conjunto característico de factores de transcripción de tipo homeodominio (HD) y de proteínas proneurales de tipo bHLH (Fig. 1D; Briscoe *et al.*, 2000). En la zona ventral, la señalización de Shh, a través de los factores de transcripción Gli, controla la identidad de las interneuronas ventrales y las motoneuronas mediante la regulación de la expresión de factores HD y bHLH concretos. De la misma forma, en la zona dorsal son los gradientes de Wnts y BMPs los encargados de otorgar información posicional a los progenitores e interneuronas que también expresarán una combinatoria específica de factores de transcripción que los definan, como se explicará más en detalle en la sección 2.2.

2.1 La formación del patrón ventral y la vía de Shh

La producción de Shh comienza en la notocorda subyacente al tubo neural y, posteriormente, Shh induce su propia producción en las células de la placa del suelo a través del factor de transcripción FoxA2 (Dessaud *et al.*, 2008; Placzek & Briscoe, 2005). Para que las moléculas de Shh sean biológicamente activas deben sufrir un procesamiento autocatalítico del precursor, ser modificadas post-traduccionamente mediante la unión de un residuo de colesterol en su extremo C-terminal y palmitoladas en el extremo N-terminal. Una vez secretado, Shh interacciona con diferentes proteínas de superficie y de matriz extracelular y difunde a lo largo de varios diámetros celulares formando un gradiente de concentración V-D (Dessaud *et al.*, 2008).

En las células diana Shh se une al receptor Patch (Ptc) lo cual provoca que éste deje de reprimir a Smoothed (Smo), y permite la transducción intracelular de la señalización que tiene lugar mediante la regulación de los efectores Gli (Ribes & Briscoe, 2009). En

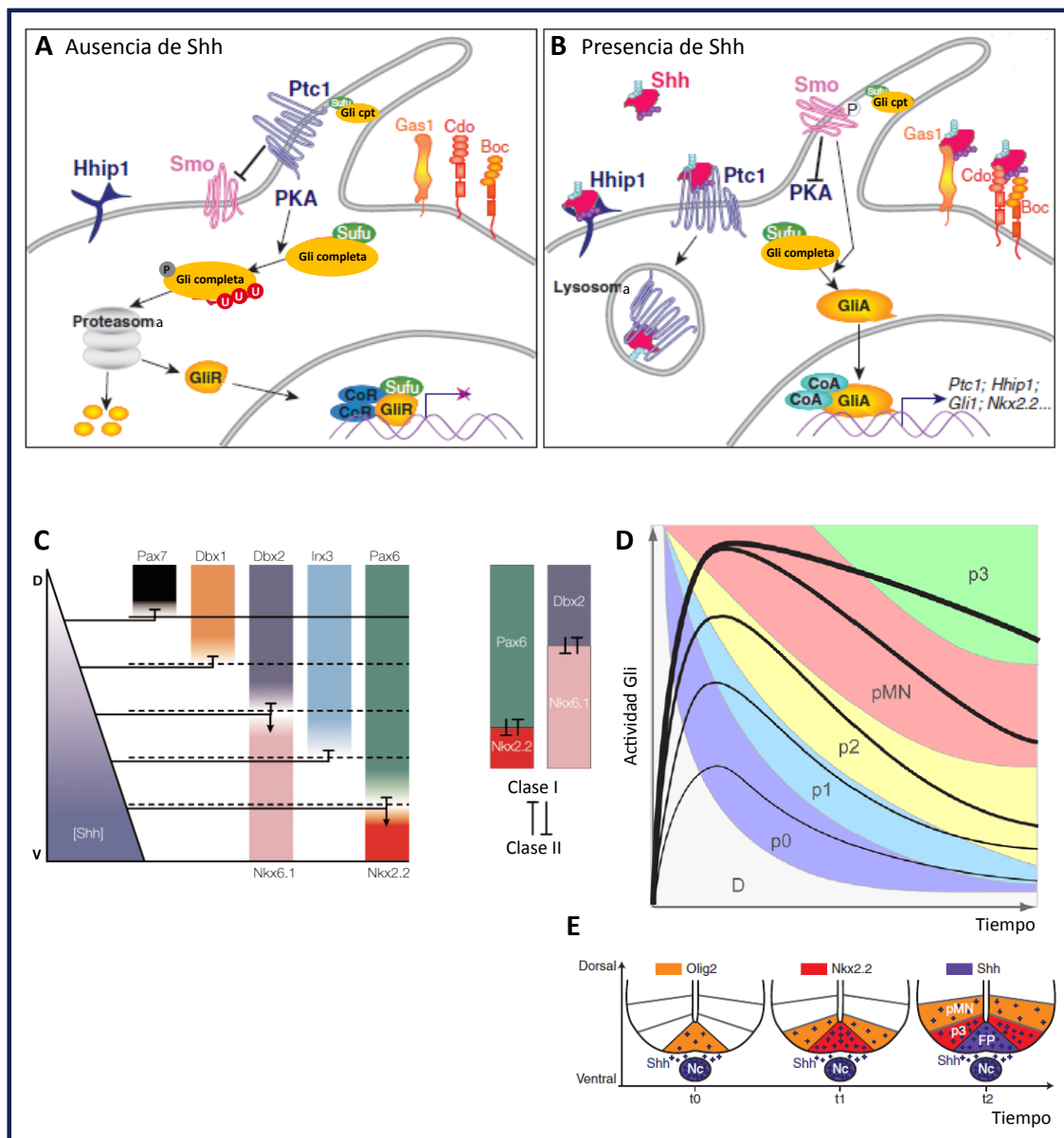


Fig. 2. Vía de señalización de Shh y generación del patrón ventral. (A) En ausencia de ligando el receptor Ptc1 bloquea Smo y la proteína quinasa A (PKA) fosforila la forma completa de Gli marcándola así para degradación o para actuar como un represor transcripcional. (B) En presencia de Shh, Smo bloquea la actividad de PKA permitiendo que se genere la forma activa de Gli mediante proteólisis y que funcione como un activador transcripcional. (C) El gradiente V-D de Shh controla la especificación de los distintos dominios de progenitores ventrales. Shh activa la expresión de los factores de transcripción de Clase II de manera dosis-dependiente y a determinados niveles inhibe los de clase I. Entre los factores de transcripción de clase I y II se establecen relaciones de represión cruzada. (D) Modelo de la generación del patrón ventral. La identidad posicional de cada uno de los progenitores de interneuronas (p0-p3 y pMN) depende del tiempo (abscisas) y de los niveles de Gli activo (ordenadas). Los diferentes dominios están representados en distintos colores y las líneas negras representan la actividad de Gli generada a diferentes concentraciones de Shh, cuanto más gruesa es la línea mayor es la concentración de Shh. Los progenitores más ventrales requieren mayores niveles y duración de la actividad de Gli. (E) La especificación de los diferentes dominios ventrales es progresiva. Cuando las células empiezan a recibir Shh expresan Olig2, un FT característico de poblaciones intermedias, de forma progresiva y a medida que aumenta la cantidad de Shh que reciben, Olig2 deja de expresarse y se inicia la expresión de marcadores de poblaciones más ventrales como Nkx2.2. NC: notocorda, FP: placa del suelo. Modificado de: (A, B y E) (Ribes & Briscoe, 2009); (C) (Jessell, 2000) y (D) (Dessaud *et al.*, 2010).

ausencia de Shh, Gli3 se proteoliza y actúa como un represor, mientras que en presencia del ligando se bloquea la proteólisis y Gli3 funciona como un activador transcripcional de la ruta (Fig. 2A,B). La existencia del gradiente V-D de Shh posibilita que las células de la línea media ventral estén expuestas a concentraciones crecientes de Shh mientras éste se expande dorsalmente (Fig. 2C). Pero, además de la concentración, es esencial el tiempo de exposición al morfógeno. De esta manera, para que las poblaciones más ventrales adquieran su identidad definitiva es necesario que se encuentren expuestas a mayores concentraciones del morfógeno durante un período de tiempo más prolongado (Fig. 2D). Así, cuando empiezan a recibir Shh las células ventrales adoptan la expresión de factores de transcripción propios de poblaciones intermedias como Olig2 (pMN) y, progresivamente, Olig2 deja de expresarse y se inicia la expresión de factores de transcripción característicos de las poblaciones más ventrales como Nkx2.2 (dp3, Fig. 2E). Además, para que se mantenga la identidad adquirida es necesario que la señalización perdure en el tiempo (Dessaud *et al.*, 2010; Dessaud *et al.*, 2007).

Las proteínas de tipo HD que expresan los progenitores ventrales se clasifican en dos grupos en función de su regulación por parte de Shh (Fig. 2C; Briscoe *et al.*, 2000). Los factores de clase I como Pax7, Irx3 o Pax6 se expresan inicialmente de forma constitutiva en todo el tubo neural y, posteriormente, su expresión estará reprimida a partir de un umbral específico de Shh, lo cual delimita los bordes ventrales de las poblaciones. Por el contrario, la expresión de las proteínas de clase II como Nkx6.1/2, Nkx2.2/9 u Olig2 requiere de la señalización de Shh y se activa a partir de niveles específicos de Shh que definen el borde dorsal de sus dominios de expresión (Briscoe & Ericson, 2001). Entre algunas parejas de factores de clase I y clase II se producen mecanismos de represión cruzada que refinan los bordes de los diferentes dominios y, por tanto, refuerzan el mantenimiento de la identidad de los progenitores (Briscoe *et al.*, 2000).

2.2 Vías de señalización implicadas en la formación del patrón dorsal

En la zona dorsal del tubo neural existen diferentes mecanismos moleculares que limitan la actividad de la señalización ventral sobre los progenitores. Es el caso de las señales de Wnt y BMP que, procedentes de la placa del techo, controlan la identidad dorsal de las poblaciones neurales.

2.2.1 La vía de Wnt

La familia de las proteínas Wnt está formada por un gran número de proteínas secretables relacionadas con la proteína Wingless de *Drosophila*, que están implicadas

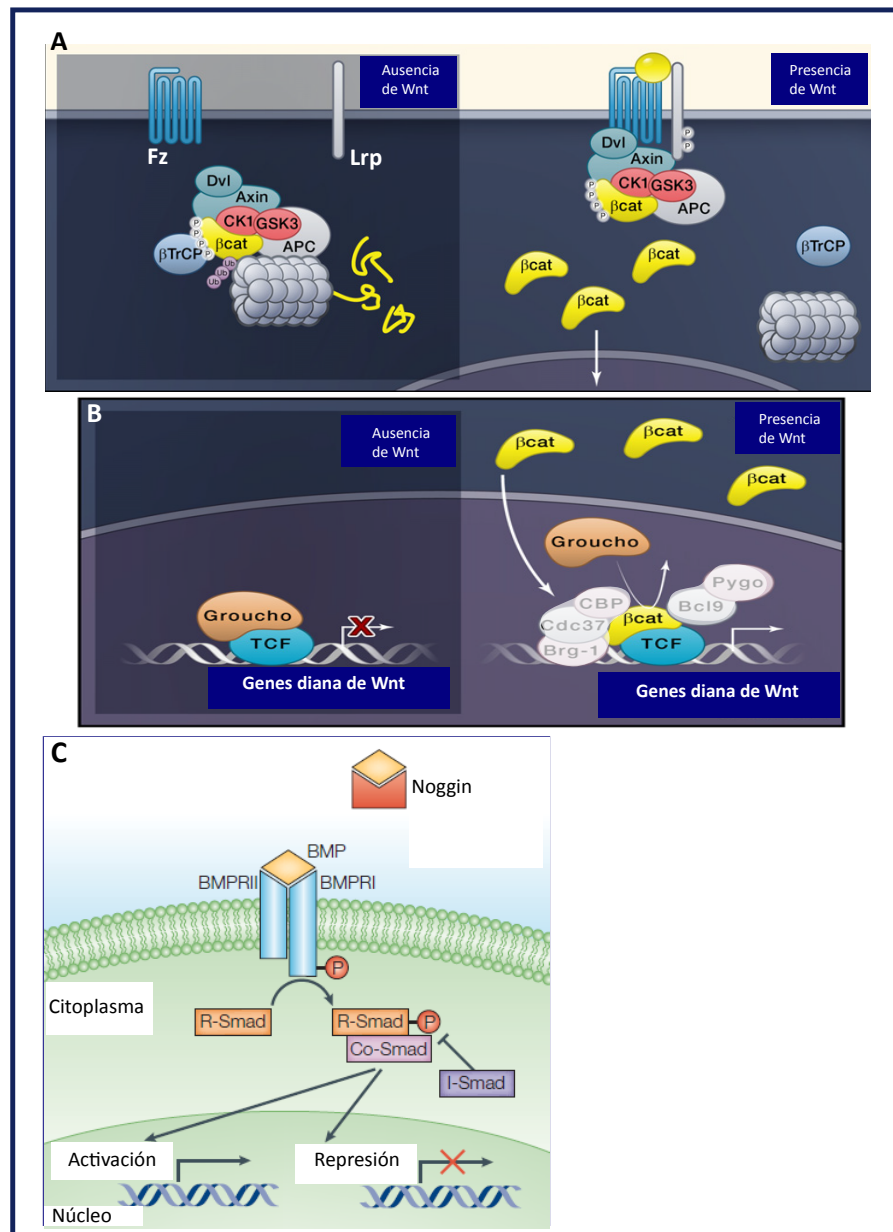


Fig. 3. Vías de señalización implicadas en la generación del patrón dorsal en la médula espinal. (A) Vía de Wnt. En ausencia de ligando, β -catenina se fosforila, ubiquitina y degrada por el proteasoma dentro del complejo de destrucción formado por Dvl, Axina, CK1, GSK3, APC y β TrCP. Cuando Wnt se une a su receptor Fz, β TrCP se separa del complejo y deja de ubiquitinar β -catenina, se satura el complejo y la β -catenina de nueva síntesis queda libre para translocar al núcleo. (B) En ausencia de Wnt los genes diana de la vía se encuentran reprimidos por la Tcf y el correpresor Groucho mientras que en presencia de ligando Groucho se separa de Tcf, β -catenina se une a Tcf y activan la transcripción de los genes diana de la vía de Wnt. (C) Vía de señalización de BMP. La unión de los ligando BMP a sus receptores I y II provoca la fosforilación de las Smad dependientes de receptor (R-Smad) que junto con co-Smad se translocan al núcleo donde regulan la transcripción de numerosos genes, pueden activarla actuando junto con coactivadores o reprimirla en presencia de correpresores. Modificado de: (A y B) (Clevers & Nusse, 2012) y (C) (Liu & Niswander, 2005).

en la regulación de distintas interacciones celulares durante la embriogénesis (Logan & Nusse, 2004). En el control de la especificación de patrones en el tubo neural, las proteínas Wnt actúan a través de la ruta canónica o de β -catenina de señalización.

En la ruta canónica las proteínas Wnt se unen a los receptores de la familia Frizzled (Fz) y a los correceptores LRP (*Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein*) en la superficie celular. Esta interacción provoca la transducción de la señal a través de proteínas intracelulares como Dishevelled (Dsh), Glucógeno sintetasa 3β (GSK3 β), Axina1/2, *Adenomatous Poliposis Coli* (APC) y el regulador transcripcional β -catenina. En ausencia de señalización los niveles de β -catenina citoplasmática son bajos, puesto que se encuentra secuestrada en el complejo de destrucción formado por GSK3 β /Axina/APC (Fig. 3A). GSK3 β y la Caseína quinasa I (CKI) fosforilan β -catenina en los residuos Ser33, Ser37, Ser45 y Thr45 (Valenta *et al.*, 2012) de su extremo N-terminal. La β -catenina fosforilada es reconocida por la E3 ligasa β -TrCP encargada de su ubiquitinación y, por tanto, de marcarla para su degradación vía proteasoma. Así, el proceso de fosforilación y ubiquitinación de β -catenina tiene lugar mientras permanece unida al complejo de destrucción.

Cuando un ligando Wnt se une a sus receptores Fz, β -TrCP se separa del complejo de destrucción y se frena la ubiquitinación de β -catenina (Fig. 3A). Así, la forma fosforilada de β -catenina acaba saturando el complejo y la de nueva síntesis quedará libre en el citoplasma y podrá traslocar al núcleo para regular la actividad transcripcional de sus genes diana mediante su interacción con los factores de transcripción LEF/Tcf (Li *et al.*, 2012; Logan & Nusse, 2004). En ausencia de señalización, la expresión de los genes diana se encuentra inhibida por el complejo formado por Tcf y el correpresor Groucho (Fig. 3B).

La vía de Wnt no es una ruta catalítica en la que la unión del ligando al receptor desencadena una cascada de fosforilaciones encaminada a amplificar la señal. En la vía de Wnt, la unión del ligando a los receptores produce la fosforilación de LRP6 permitiendo así que éste reclute hacia la membrana a Axina. Aunque en vertebrados existen dos proteínas Axinas (Axina1 y Axina2), sólo Axina2 es una diana transcripcional directa de la vía y, por tanto, al formar parte del complejo de destrucción de β -catenina, establece un bucle de autorregulación negativa de la ruta. Además, Axina1 y Axina2 son los factores limitantes en la transducción de la señal posibilitando que la vía funcione mediante un mecanismo estequiométrico y no catalítico (Clevers & Nusse, 2012). Sin embargo, se desconoce qué otros factores, aparte de la vía de Wnt, puedan estar implicados en la modulación de la expresión de las Axinas.

La vía de Wnt/ β -catenina está regulada también mediante proteínas secretables que anatanagonizan o estabilizan la interacción de Wnt con sus receptores. Entre ellas están las SFRPs (*Secreted Frizzled Related Proteins*) y las proteínas inhibitorias de Wnt (WIF;

Bovolenta *et al.*, 2008), que se unen a Wnts. Por otro lado existen también inhibidores que se unen al corresponsor LRP5/6 como las de las familias Dickkopf y WISE/SOST (Clevers & Nusse, 2012).

En la placa del techo se secretan varios miembros de la familia Wnt, entre los que destacan Wnt1 y Wnt3, mientras que varios receptores Fz presentan distintos patrones de expresión a lo largo del eje D-V, entre ellos Fz10 se expresa en la mitad dorsal del tubo neural (Cauthen *et al.*, 2001; Chesnutt *et al.*, 2004). En la zona dorsal del tubo neural la vía de Wnt, a través de β -catenina/Tcf, controla directamente la expresión de genes proneurales como Ngn1 o Math1 (Hirabayashi *et al.*, 2004; Ille *et al.*, 2007; Muroyama *et al.*, 2002) que son necesarios para el establecimiento de los diferentes dominios de progenitores. Wnt1 y Wnt3a son requeridos también en la especificación de las interneuronas dl1-dl3 (Lhx2/9⁺, Lhx1/5⁺ e Islet1⁺). En mutantes de ambos ligandos Wnts el número de interneuronas de estas poblaciones disminuye a expensas de una expansión de los dominios intermedios dl4-dl6, que ocupan así zonas más dorsales de las que le corresponden (Muroyama *et al.*, 2002). Además, estos cambios en las poblaciones de interneuronas se corresponden con las alteraciones observadas en los respectivos dominios de progenitores de los que proceden.

Por otra parte, en experimentos de sobre-expresión de β -catenina en la zona más dorsal del tubo neural (donde se expresa Wnt1) se observa un incremento de la población de progenitores dp1 (Math1⁺) pero una disminución de los dp2-dp3 (Ille *et al.*, 2007). Sin embargo, cuando la expresión ectópica tiene lugar en regiones más extensas a lo largo del eje D-V, se produce un incremento de las poblaciones de interneuronas dl2 y dl3 a costa de la disminución de las poblaciones intermedias dl4-dl6 (Zechner *et al.*, 2007). En resumen, en ambas aproximaciones se observa una expansión de las poblaciones más dorsales a expensas de la disminución de las poblaciones intermedias.

2.2.2 Interacción entre las vías de Wnt y Shh en el establecimiento del patrón D-V

La generación del patrón D-V completo requiere del control de la actividad de las vías de Wnt y Shh en las regiones dorsales y ventrales, respectivamente. En embriones de pollo se ha observado que la sobre-expresión, tanto de Wnt1/Wnt3a como de β -catenina, provoca una dorsalización de los progenitores ventrales que se detecta tanto por la expansión de la expresión de genes dorsales e intermedios como Pax6 y Pax7 como por la reducción de genes ventrales como Nkx2.2 y Olig2 (Alvarez-Medina *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2008). Por ello, para que se produzca una correcta especificación a lo largo del tubo neural, la actividad de Wnt debe quedar restringida a la zona dorsal. Además, esta expansión en los dominios de los progenitores en situaciones de sobreactivación de Wnt

provoca un aumento del número de interneuronas dorsales dl2, dl3 y dl4, a expensas de la reducción de las intermedias y ventrales dl6, v0 y v1.

Un posible mecanismo de regulación entre las vías de Wnt y Shh es a través del control transcripcional de las proteínas Gli. Así, se ha descrito que la activación de Wnt provoca un incremento de la expresión de Gli3 y, dado que éste es un inhibidor de la vía de Shh, restringe dorsalmente la actividad de la vía de Shh (Alvarez-Medina *et al.*, 2008). Otro mecanismo de interacción tiene lugar a través de la actividad de proteínas Tcf con capacidad represora. Este es el caso del promotor del gen diana de la vía de Shh Nkx2.2, expresado en vp3, que presenta dos sitios de unión de Tcf responsables de limitar la expresión dorsal de Nkx2.2, antagonizando así la activación debida a Gli (Lei *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2011).

No obstante, deben existir otras señales y mecanismos moleculares que se encuentren implicados tanto en la coordinación de estas dos rutas de señalización como en la integración de las diferentes señales para el correcto control de la regionalización, la proliferación y la diferenciación celulares.

2.2.3 La vía de TGF- β

La placa del techo produce diferentes proteínas BMPs, pertenecientes a la superfamilia de TGF- β (*Transforming Growth Factor β*). Estas proteínas se unen a sus receptores tipo I y tipo II y controlan la actividad transcripcional de los genes diana a través de los complejos de las proteínas reguladas por receptor o R-Smad, Smad1 y 5 (Fig. 3C). La proteína Smad4 o *common-mediator* Smad (co-Smad) actúa como pareja de las proteínas R-Smad una vez que éstas son fosforiladas. Juntas entran al núcleo, donde actúan como factores de transcripción. Las proteínas inhibitorias de las Smads (I-Smads, Smad6 y Smad7) compiten con las R-Smads por la unión al receptor de tipo I y a Smad4 (Fig. 3C; Liu & Niswander, 2005). Experimentos de exceso de función han demostrado que los cambios locales en la actividad BMP provocan diferentes respuestas en el patrón de los progenitores (Timmer *et al.*, 2002). Así, la sobre-expresión de BMP aumenta el número de progenitores dp1 (Cath1⁺) y disminuye los dp2-dp3 (Ngn1⁺ y Cash1⁺, respectivamente; Timmer *et al.*, 2002).

La señalización de BMP contribuye también al mantenimiento de la identidad dorsal del tubo neural mediante la regulación del límite dorsal de marcadores característicos de poblaciones intermedias como son Dbx1 y Dbx2 (Timmer *et al.*, 2002). Además, el estudio de las interneuronas derivadas de estos progenitores demuestra que únicamente se produce un incremento en el número de interneuronas más dorsales dl1 (Lhx2⁺) mientras que disminuyen las dl2-dl3 (Lhx1/5⁺ e Islet1⁺, respectivamente; Chesnutt *et*

al., 2004; Timmer *et al.*, 2002) por lo que deben de existir otras señales implicadas en la diferenciación de los demás tipos de interneuronas dorsales. Estas señales, como hemos comentado en secciones anteriores, incluyen las de la vía de Wnt.

En cuanto a la posible regulación cruzada de la vía de BMP con la vía de Wnt, algunos estudios han demostrado que BMP4 puede regular el dominio dorsal de expresión de Wnt1/3a (Chesnutt *et al.*, 2004). La falta de función de Wnt y la de BMP generan fenotipos muy similares. Sin embargo, la activación de la vía de Wnt en ratones con déficit en la vía de BMP no es suficiente para rescatar las poblaciones de progenitores más dorsales aunque sí se produce un incremento de la proliferación celular (Chesnutt *et al.*, 2004). Por tanto, la señalización de BMP controlaría la especificación de las interneuronas más dorsales (dl1), regulando la expresión de Math1 en los progenitores, mientras que la actividad de la vía de Wnt sería la responsable de la especificación de las interneuronas dorsales dl2-dl3 a través, entre otros, del control de la expresión de Olig3 en los progenitores dp1-dp3 (Zechner *et al.*, 2007).

Además de los BMPs, otros miembros de la superfamilia de TGF- β se encuentran también implicados en la regionalización dorsal. Entre ellos están las activinas, ligandos que se expresan en la zona dorsal del tubo neural, y cuya actividad transcripcional está mediada por las R-Smads Smad2 y 3. En el tubo neural de embriones de pollo, el exceso de función de activina produce una expansión hacia las zonas más dorsales de marcadores de progenitores como Ngn1 y Cash1, aunque sólo aumenta el número de las interneuronas dl3 debido a una diferenciación prematura e incrementada de los progenitores dp3 (Timmer *et al.*, 2005).

3. Control de la proliferación en la médula espinal

Durante el desarrollo del tubo neural el establecimiento del patrón D-V ocurre en coordinación con el crecimiento del tubo neural. Éste está determinado tanto por el crecimiento celular como por la tasa de proliferación de los progenitores, la salida del ciclo celular, la diferenciación y la muerte celular. Como se ha descrito anteriormente, tanto la vía canónica de Wnt como la vía de Shh controlan la proliferación de los progenitores en el tubo neural y, por tanto, también su crecimiento (Megason & McMahon, 2002).

La vía de Wnt controla directamente la expresión de reguladores de la fase G1 del ciclo celular como Ciclina D1 y Ciclina D2 (Kenney *et al.*, 2003; Megason & McMahon, 2002; Tetsu & McCormick, 1999; Ulloa & Briscoe, 2007), c-Myc (He *et al.*, 1998) y N-Myc (Kuwahara *et al.*, 2010; ten Berge *et al.*, 2008). Shh también regula Ciclinas D (Duman-Scheel *et al.*, 2002; Kenney & Rowitch, 2000), N-Myc (Cayuso *et al.*, 2006; Kenney *et al.*, 2003; Oliver *et al.*, 2003), c-Myc (Milla *et al.*, 2012) y puede controlar la expresión de

reguladores de la transición G2/M como las Ciclinas A, B y E (Kenney & Rowitch, 2000; Locker *et al.*, 2006).

Además, en el mesencéfalo del pez cebra Wnt regula la proliferación, al menos en parte, a través de los genes diana Zic2a y Zic5, por lo que estos genes u otros de la familia Zic podrían también estar implicados en el control de la proliferación en la médula espinal (Nyholm *et al.*, 2007). En el tubo neural se ha descrito también la participación de Tcf3a/b en proliferación (Bonner *et al.*, 2008).

La activación transcripcional de Ciclina D1 por parte de β -catenina/Tcf está mediada por la unión del complejo a sitios específicos de su promotor (Shtutman *et al.*, 1999). Así, un exceso de β -catenina activa produce un incremento del tamaño del tubo neural como consecuencia del aumento de la tasa de proliferación de los progenitores y de la disminución de su diferenciación (Zechner *et al.*, 2003). Además, en cultivos de células neuroepiteliales se ha observado que la vía de BMP bloquea la inducción de Ciclina D1 por Wnt. Se ha propuesto que el equilibrio entre la proliferación inducida por Wnt y la diferenciación dorsal promovida por BMP (Ille *et al.*, 2007) podría ser, en parte, el responsable de la coordinación del crecimiento del tubo neural y la generación del patrón dorsal, al menos en las regiones más dorsales. Sin embargo, esto sólo explica una parte del proceso.

En conjunto, existen numerosos estudios acerca de la participación de las diferentes vías de señalización en la generación del patrón D-V en el tubo neural y en la proliferación, pero existen pocas evidencias acerca de los mecanismos moleculares implicados en la coordinación de las diferentes vías y procesos entre sí.

4. La familia de genes Sox

Desde el descubrimiento de Sry como factor de diferenciación sexual masculina en mamíferos (Gubbay *et al.*, 1990) y por homología con su dominio de unión al ADN (caja HMG), se han caracterizado numerosos factores de transcripción que se agrupan bajo el nombre de genes Sox (por *Sry-related HMG box*). Existen al menos 20 de estos genes Sox en mamíferos y se organizan en 8 grupos (A-H) en función de la homología de secuencia del dominio HMG (Fig. 4; Bowles *et al.*, 2000).

4.1 Análisis filogenético y estructural.

La principal característica de los factores Sox es la presencia del dominio HMG por el que se unen al surco menor del ADN. Este dominio está formado por 79 aminoácidos (aa) organizados en tres hélices alfa que se disponen en forma de L. Otros factores de

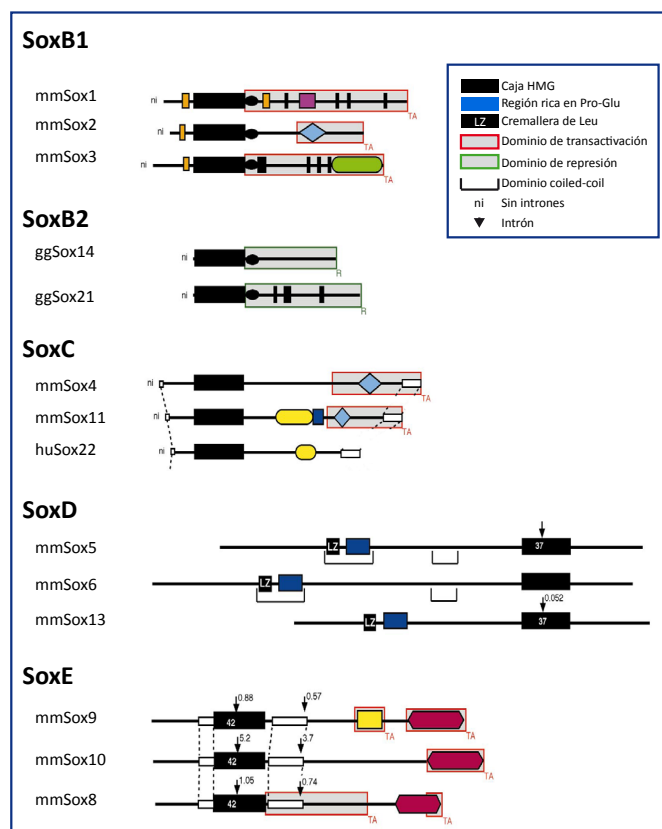


Fig. 4. Estructura y clasificación de los genes Sox. En el esquema se representa la estructura y los dominios de los cinco grupos de genes Sox cuyos miembros participan en el desarrollo del sistema nervioso: SoxB1, SoxB2, SoxC, SoxD y SoxE. Todos los miembros de un mismo grupo comparten estructura y la organización de sus dominios como la posición de la caja HMG. LZ: cremallera de leucina; TA: dominio de transactivación; R: dominio de represión; ni: sin intrones. Modificado de (Bowles *et al.*, 2000).

transcripción conocidos como los Tcf/Lef también presentan una caja HMG. La unión de la caja HMG al ADN produce una torsión en el mismo con un ángulo de de 70-85°, sin provocar una alteración en la conformación de la caja HMG. Su capacidad de plegar el ADN lleva a pensar que las proteínas Sox puedan actuar como organizadoras locales de la estructura de la cromatina y que permitan la agregación de otros factores para formar complejos multiprotéicos (Lefebvre *et al.*, 1998; Wegner, 2010).

En el HMG se encuentran también las secuencias responsables de la importación y exportación nuclear de las proteínas. La dinámica de importación-exportación podría estar regulada post-transcripcionalmente mediante fosforilación-defosforilación. Ese es el caso de Sox9 que, tras ser fosforilado por la proteína quinasa A (PKA), ve potenciada su actividad transcripcional en el contexto del promotor del gen Col2a1 (Huang *et al.*, 2000).

Fuera del dominio HMG, estas proteínas presentan regiones ricas en lisinas que también se encuentran sujetas a modificaciones postraduccionales como acetilaciones y sumoilaciones (Bernard & Harley, 2010). Por ejemplo, la sumoilación de Sox10 reprime su actividad transcripcional en algunos de sus genes diana (Girard & Goossens, 2006). Además, la acetilación de Sox9 en los mismos residuos que están sujetos a sumoilación provoca un incremento en su actividad transcripcional en el promotor del Col2a1 (Hattori *et al.*, 2008).

La caja HMG de las proteínas Sox reconoce una secuencia consenso de unión al surco menor del ADN 5'-(A/T)(A/T)CAA(A/T)G-3'. Este motivo es tan corto y está tan degenerado que se encuentra en gran cantidad en los genomas y, además, es reconocido por todas las proteínas Sox, por lo que es poco específico. Por ello, es posible que para la selección de los sitios de unión sea importante la presencia de secuencias adyacentes concretas. Así, algunas proteínas de los grupos SoxE y SoxC muestran preferencia por la existencia de AG en el extremo 5' y G o GC en el 3' (Wegner, 2010). Algunos factores Sox reconocen también secuencias que presentan dos sitios de unión adyacentes y que permitirían la dimerización de las proteínas que se unan a ellos, como es el caso de los miembros de la familia SoxE que pueden dimerizar cuando se unen a dos sitios separados por 3-6 pb (Wegner, 2000). Además, uno de los sitios de unión puede presentar una o dos bases de diferencia con respecto a la secuencia consenso constituyendo así un sitio de unión muy débil (Wegner, 2010).

Las proteínas Sox de un mismo subgrupo tienen una estructura genómica parecida y comparten dominios estructurales (Fig. 4). Así, la posición del HMG y la longitud total de la proteína constituyen unas de las características más conservadas de las proteínas Sox pertenecientes a un mismo grupo (Bowles *et al.*, 2000)2000. Algunos de estos factores presentan dominios de transactivación (Fig. 5) que pueden estar implicados también en la interacción con otras proteínas y en la determinación de su configuración final (Wegner, 2010). Otras proteínas de esta familia presentan dominios de represión o carecen de este tipo de dominios (Fig. 5) y su actividad transcripcional depende de las proteínas con las que interaccionen.

Genes Sox (<i>Mus musculus</i>)	
SoxA	Sry
SoxB1	Sox1
	Sox2
	Sox3
SoxB2	Sox14
	Sox21
SoxC	Sox4
	Sox11
	Sox12
SoxD	Sox5
	Sox6
	Sox13
	(Roose et al., 1998)
SoxE	Sox8
	Sox9
	Sox10
SoxF	Sox7
	Sox17
	Sox18
	(Takash et al., 2001)
SoxG	Sox15
	(Yamada et al., 2006)
SoxH	Sox30
	(Osaki et al., 1999)
Actividad transcripcional:	
Activador	
Represor	
Carece de dominio de transactivación	

4.2 Interacción de los factores Sox con otras proteínas

Uno de los mecanismos de adquisición de especificidad de los factores Sox es a través de su interacción con otras proteínas. Existen numerosas proteínas que interaccionan con los factores Sox entre las cuales se encuentran proteínas adaptadoras, factores de transcripción y factores de importación al núcleo (Tabla 1; Kondoh & Kamachi, 2010; Wilson & Koopman, 2002).

Fig. 5. Actividad transcripcional de las proteínas Sox. Factores de transcripción Sox con dominios de transactivación o de represión en ratón. Modificado de (Kiefer, 2007).

La interacción de los factores Sox con otras proteínas les permite actuar como activadores o represores de la transcripción en diferentes contextos celulares. Entre todas ellas es importante destacar la interacción con proteínas modificadoras de histonas (Bernard & Harley, 2010; Kondoh & Kamachi, 2010; Wegner, 2010), como Sox9 que interacciona con Tip60 (Hattori *et al.*, 2008) o Sox5 con HDAC1 y CTBP2 (Stolt *et al.*, 2008); ya que éstas permiten que se produzca una remodelación local de la cromatina. Otro mecanismo de regulación transcripcional en el grupo SoxE es a través de su interacción directa con miembros de la maquinaria de transcripción (Zhou *et al.*, 2002).

Existen así muchos tipos de proteínas con las cuales pueden interactuar los factores Sox en función del momento del desarrollo y del territorio en el cual estén actuando, lo que les confiere una gran versatilidad funcional.

4.3 Grupo de factores SoxD

El grupo SoxD está formado por los genes Sox5, Sox6 y Sox13. Los miembros de este grupo son los que tienen un mayor número de exones, entre 12 y 17 dependiendo de la especie (Schepers *et al.*, 2002). Contienen además un intrón dentro de la caja HMG que se encuentra conservado con los grupos E y F (Bowles *et al.*, 2000). Esta estructura supone también la existencia de un procesamiento complejo del ARN primario que genera una mayor diversidad de isoformas. Por ejemplo, en ratón existe una isoforma de Sox5 de 392 aa que se expresa únicamente en los testículos de los animales adultos mientras que las isoformas largas de 763 y 728 aa se expresan en el embrión en desarrollo (Denny *et al.*, 1992; Lefebvre *et al.*, 1998).

Para los factores de la familia D no se han descrito dominios de transactivación. Además, este es el único grupo en el que la caja HMG se localiza cerca del extremo C terminal de la proteína. Ésta presenta una identidad del 87% entre las cajas HMGs de las distintas proteínas SoxD en ratón y humanos, y menos de un 60% con la de otras proteínas Sox (Lefebvre, 2010). Fuera del dominio HMG los factores SoxD tienen zonas de interacción con otras proteínas mediante dominios *coiled-coil* que se encuentran mayoritariamente en el extremo N-terminal. Gracias a ellos, Sox5 y Sox6 pueden formar homo o heterodímeros en solución (Han & Lefebvre, 2008; Lefebvre *et al.*, 1998) y actuar de forma cooperativa en diferentes procesos del desarrollo (Stolt *et al.*, 2006). En función del tejido y del momento del desarrollo, los factores SoxD pueden interaccionar con otros miembros de la familia u otras proteínas en el contexto de distintas regiones reguladoras génicas. La unión de los factores SoxD a dos secuencias consenso cercanas es independiente de la orientación de las mismas, pero deben estar distanciadas entre 0 y 19 pb (Lefebvre, 2010).

La expresión de los genes Sox5 y Sox6 coincide en algunos tejidos con la de miembros de la familia SoxE y las proteínas de ambos grupos establecen entre sí diferentes relaciones. Por ejemplo, en el contexto de la condrogénesis Sox5 y Sox6 actúan junto con Sox9 (forman el Sox Trio) activando sinérgicamente genes específicos de la matriz extracelular (Han & Lefebvre, 2008; Lefebvre *et al.*, 2001; Smits *et al.*, 2001). Por el contrario, durante la oligodendrogénesis, Sox5 y Sox6 compiten con Sox10 por los sitios de unión de genes de mielina bloqueando la diferenciación terminal de los oligodendrocitos (Stolt *et al.*, 2006).

4.4 Interacción de las proteínas Sox con la vía de Wnt

La vía de Wnt está activa en muchos de los tejidos en los que también se expresan los genes Sox y se encuentra implicada en numerosos procesos diferentes del desarrollo. Muchos de ellos pueden estar regulados, al menos parcialmente, por las proteínas Sox (Tabla 1). La primera evidencia que se tuvo de la interacción de estas proteínas con la vía de Wnt fue la demostración de la represión de la ruta a través de la interacción directa de Sox17 y Sox3 con β -catenina en *Xenopus* (Zorn *et al.*, 1999). Desde entonces se han

Sox	Proteína con la que interacciona	Función
SRY	β -catenina	Represión de Wnt en determinación sexual
Sox2	β -catenina	Represión de Wnt en la diferenciación ósea
	Oct4	Activación transcripcional de Ciclina D1 en cáncer de mama
	Pax6	Mantenimiento de células madre
		Desarrollo del cristalino
Sox3	β -catenina	Represión de Wnt en la formación del eje de <i>Xenopus</i>
Sox4	β -catenina	Promueve la activación de la vía de Wnt en células de cáncer de colon
Sox5	Sox5/Sox6	Activación de la condrogénesis
		Impiden la diferenciación terminal de los oligodendrocitos
Sox6	β -catenina/HDAC1	Represión de la expresión de Ciclina D1 en células β pancreáticas
Sox13	Tcf	Represión de Wnt en el desarrollo de los linfocitos
Sox9	Sox9	Activación de la condrogénesis
	β -catenina	Represión de la vía de Wnt en condrogénesis
	Tcf	Represión de Ciclina D1 y C-Myc en el intestino
	Tip60	Activación transcripcional de Col2a1
	CBP	Activación de la condrogénesis
	P300	Activación de la condrogénesis
	Med12/Trap230	Activación transcripcional de Col2a1
Sox10	Sox10	Activación transcripcional de la glicoproteína de la mielina
	Brn2/Oct6	Activación de Krox20 en células de Schwann
	Pax3	Activación de MITF en el desarrollo de melanocitos
	MITF	Activación de Dct en el desarrollo de melanocitos
Sox17	β -catenina	Represión de la expresión de Ciclina D1 en oligodendrocitos
		Represión de Wnt en células de cáncer de colon
		Represión de Wnt en la formación del eje de <i>Xenopus</i>

Tabla 1. Resumen de la interacción de los factores de transcripción Sox con otras proteínas. Estas interacciones otorgan especificidad a la actividad de las proteínas Sox en diferentes procesos de desarrollo.

descrito numerosos procesos de desarrollo en los cuales la regulación de la vía de Wnt está mediada por proteínas Sox de mamíferos.

El control de la ruta canónica de Wnt por parte de las proteínas Sox puede realizarse a través de varios mecanismos. Por una parte, y puesto que las proteínas Tcf/LEF presentan también un dominio HMG de unión al ADN, existe una gran similitud entre las secuencias que ambos tipos de proteínas reconocen para su unión. Por tanto, los factores Sox pueden competir con Tcf/LEF por los mismos sitios de unión en los promotores de los genes, como ocurre en el locus de NeuroD, y regular así su transcripción (Kuwabara *et al.*, 2009).

Por otra parte, las proteínas Sox pueden interaccionar directamente con β -catenina (Tabla 1; Akiyama *et al.*, 2004; Iguchi *et al.*, 2007). β -catenina es un miembro de la familia Armadillo que contiene un dominio central formado por 12 repeticiones armadillo (Jamieson *et al.*, 2012). Cada uno de estos motivos tiene unos 40 aa que se organizan en dos hélices α y conforman una horquilla. Las repeticiones armadillo actúan como un soporte a través del cual se produce la interacción con numerosas proteínas. Por ejemplo, Sox6 interacciona con β -catenina a través de los dominios *coiled-coil* y la región adyacente rica en glutamina y las repeticiones armadillo 1-4 de β -catenina en las células β pancreáticas, recluta la histona desacetilasa 1 (HDAC1) y reprime la transcripción de Ciclina D1 (Iguchi *et al.*, 2007). Puesto que las proteínas Sox se unen a una región diferente de β -catenina a la que interactúa con Tcf, los factores Sox podrían estar bloqueando la formación del complejo β -catenina/Tcf, impidiendo su actividad transcripcional.

Aunque en la mayoría de los procesos las proteínas Sox regulan negativamente la vía de Wnt, se han descrito también otros casos en los cuales los factores Sox tienen un efecto activador de la ruta (Sinner *et al.*, 2007). En conjunto, este mecanismo de interacción y activación/represión de los genes Sox y la vía de Wnt puede resultar muy importante para la regulación fina, dependiente tanto del momento del desarrollo como del contexto celular, de las funciones en las que la vía de Wnt y las proteínas Sox están involucradas.

5. Los genes Sox durante el desarrollo del sistema nervioso

Los miembros de la familia Sox participan en multitud de procesos del desarrollo del sistema nervioso (ver Anexo I). Además, dada la similitud estructural de algunas de estas proteínas, en ocasiones presentan actividades redundantes (Lefebvre *et al.*, 1998), mientras que en otros casos se produce una actividad secuencial de diferentes factores Sox con funciones complementarias en un mismo tejido.

Así, los genes del grupo SoxB1 (Sox1, Sox2 y Sox3) participan en el mantenimiento de los progenitores neurales indiferenciados en el sistema nervioso central (Sandberg *et al.*, 2005), contrarrestando la actividad de proteínas proneurales como Ngn2 (Bylund *et al.*, 2003; Pevny & Nicolis, 2010). Por el contrario, los miembros del grupo SoxB2, como Sox21, promueven el inicio del programa de diferenciación y su expresión es inducida por Ngn2 (Sandberg *et al.*, 2005). Recientemente se ha demostrado que estos factores pueden también unirse de forma secuencial a los promotores de los mismos genes en distintos estadios del desarrollo: Sox2 en las células madre, Sox3 en las células precursoras neurales y Sox11 en las neuronas diferenciadas (Bergsland *et al.*, 2011). Por lo tanto, el balance entre las actividades de SoxB1 y SoxB2 podría determinar si una célula neural permanece como progenitor o si procede a diferenciarse.

Otro de los grupos de genes Sox muy importante en el desarrollo del sistema nervioso es el grupo SoxE, puesto que sus miembros participan en procesos como la especificación y la diferenciación de la macroglía del sistema nervioso central (Wegner & Stolt, 2005) y en la especificación, delaminación y supervivencia de las células de la cresta neural (Cheung *et al.*, 2005).

El presente trabajo se centra en el estudio de Sox5 y, en menor medida Sox6, durante el desarrollo de la médula espinal. Estos dos genes se coexpresan en muchos territorios durante el desarrollo, como condrocitos, y presentan una gran homología entre sí y, por tanto, es posible que compartan funciones en algunos procesos. Recientemente se ha descrito también la participación de estos genes en diferentes procesos del desarrollo del SN en los cuales nos centraremos.

5.1 Sox5 y Sox6 en oligodendrogénesis

Las proteínas SoxE promueven la especificación de los precursores de los oligodendrocitos y su diferenciación terminal. Desde su especificación los precursores de oligodendrocitos expresan Sox9 y Sox10. Sin embargo, para que se produzca la diferenciación terminal, en la zona en la que se encontrará la materia blanca, es necesaria la disminución de la expresión de Sox9, mientras que Sox10 toma el relevo regulando directamente la expresión de varios genes de mielina (Stolt *et al.*, 2002).

Sox5 y Sox6 también participan tanto en la especificación como en la diferenciación terminal de los oligodendrocitos. Ambas proteínas se expresan en poblaciones premigratorias de precursores de oligodendrocitos e impiden la especificación prematura de los mismos y también la diferenciación terminal de los oligodendrocitos. Para ello, compiten por los sitios de unión de Sox10 en los promotores de la proteína cero de la mielina (MPZ) y de la proteína de unión a la mielina (MBP) y se unen a ellos en forma de

dímeros (Stolt *et al.*, 2006), de manera similar a como lo hacen en el promotor del gen del Col2a1 (Lefebvre *et al.*, 2001). Resulta muy interesante que esta actividad antagónica de las proteínas SoxD con las SoxE recuerde a la relación establecida entre las SoxB1 y SoxB2 durante la neurogénesis en el tubo neural (Bylund *et al.*, 2003; Sandberg *et al.*, 2005).

5.2 Sox5 en la especificación de la cresta neural

Las células de la cresta neural son exclusivas de vertebrados y constituyen una población transitoria de células pluripotentes que se origina en el borde entre el ectodermo neural y el no neural que genera la epidermis. La producción de estas células implica procesos de inducción, especificación, delaminación del tubo neural y migración hasta territorios distantes donde finalmente se diferencian en neuronas y glía de sistema nervioso periférico, células pigmentarias y cartílago y hueso de las estructuras craneofaciales, entre otros tipos celulares (Morales *et al.*, 2005).

Sox5 se expresa en las células de cresta neural cefálica tanto premigratoria como migratoria (Perez-Alcala *et al.*, 2004). Mediante experimentos de exceso de función de Sox5 en embriones de pollo, se ha determinado que induce la expresión de genes como Snail2, FoxD3 y Sox10 y que promueve la transición epitelio-mesénquima de las células de cresta y, por tanto, su delaminación. En el caso de la cresta neural cefálica, la expresión de Sox5 se mantiene en la glía periférica (Perez-Alcala *et al.*, 2004) y, de manera transitoria, en las neuronas de los ganglios craneales donde podría contribuir a su diferenciación (Morales *et al.*, 2007).

5.3 Sox5 y Sox6 en el desarrollo de la corteza

En el neocórtex las neuronas excitatorias de proyección y las interneuronas inhibitorias se originan a partir de poblaciones de progenitores espacialmente separadas en la zona proliferativa ventricular durante el desarrollo del telencéfalo (dorsales o zona del pallium y ventrales o zona del subpallium, respectivamente). En los progenitores neurales, Sox6 se expresa en los del pallium mientras que la expresión de Sox5 está restringida a los del subpallium. Posteriormente en el desarrollo, Sox6 se expresa en las interneuronas corticales procedentes del subpallium y Sox5 en las neuronas de proyección corticofugales que derivan del pallium (Azim *et al.*, 2009).

Durante el desarrollo de la corteza Sox5 actúa a nivel de las neuronas postmitóticas controlando el momento de diferenciación y el destino de los diferentes tipos de neuronas corticofugales e impidiendo la diferenciación prematura de las neuronas de

proyección de especificación tardía (Lai *et al.*, 2008; Shim *et al.*, 2012). Asimismo, Sox5 se encuentra implicado en el control de su migración y, por tanto, en la generación de la diversidad neuronal en el neocórtex (Kwan *et al.*, 2008). De la misma manera, Sox6 es necesario para la especificación postmitótica de diferentes subtipos de interneuronas corticales (Azim *et al.*, 2009).

A pesar de que apenas existen evidencias acerca de la implicación de los genes Sox en la generación de patrones en el SNC, en la corteza Sox5 y Sox6 podrían estar implicados en la formación del patrón D-V. Como hemos mencionado arriba, las poblaciones de progenitores dorsales y ventrales expresan de forma excluyente Sox6 y Sox5 (Azim *et al.*, 2009). Es posible que se establezcan relaciones de represión cruzada entre ellos, puesto que la pérdida de función de Sox5 provoca la expresión ectópica de Sox6 en el subpallium y viceversa, la pérdida de Sox6 ocasiona la expresión ectópica de Sox5 en el pallium. Sin embargo, sólo la falta de Sox6 en la región pallial da lugar a cambios en la identidad de los progenitores, ya que en estos casos expresan marcadores subpalliales como Mash1 u Olig2 en las zonas dorsales (Azim *et al.*, 2009). De esta forma Sox6 es el único miembro de la familia de genes Sox para el cual se ha sugerido un papel en la segregación D-V de progenitores telencefálicos y por tanto en la generación de patrones. No obstante, Sox5 podría también estar implicado en regionalización en otros territorios del SN puesto que presenta una gran homología con Sox6 y además suele actuar de forma concertada en distintos procesos del desarrollo (Stolt *et al.*, 2006).

5.4. Sox5 en el control de la proliferación en la médula espinal.

Trabajos previos de nuestro laboratorio han demostrado que Sox5 controla el momento de salida de ciclo de los progenitores en el tubo neural puesto que su expresión ectópica provoca una salida de ciclo prematura de los progenitores. Sin embargo, en ese caso el programa de diferenciación no se completa correctamente en las células con niveles elevados de Sox5 ya que se observa una reducción en el número de interneuronas en la zona del manto. Además, Sox5 contrarresta la actividad mitogénica de la vía de Wnt mediante la activación transcripcional de *Axina2*, un regulador negativo de la ruta (Martinez-Morales *et al.*, 2010). Este bloqueo de la vía podría ser el responsable de la disminución de la expresión Ciclina D1 y N-Myc que se observa cuando se produce expresión ectópica de Sox5, en comparación con los casos en los cuales sólo hay sobre-expresión de β -catenina (Martinez-Morales *et al.*, 2010). En conjunto, Sox5 está regulando la salida de ciclo de los progenitores del tubo neural a través de la modulación de Axina 2 y, por tanto, de la vía de Wnt.

Objetivos

El principal objetivo de esta tesis ha sido determinar si los genes SoxD se encuentran implicados en la regionalización de la médula espinal. Para ello se establecieron los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar si la expresión regionalizada de los genes SoxD en la médula espinal se encuentra conservada a lo largo de la evolución, comparando su expresión en el tubo neural de embriones de pollo, ratón y pez medaka.

2. Analizar si Sox5 participa en el control de la especificación de los progenitores e interneuronas dorsales en embriones de pollo y pez medaka, mediante experimentos de exceso y falta de función.

3. Estudiar el mecanismo molecular implicado en la posible función de regionalización de Sox5, estudiando su interacción con una de las vías fundamentales del control dorsal, la vía canónica de Wnt.

4. Explorar si Sox5 está implicado en la generación del patrón ventral en el tubo neural mediante la regulación de la expresión de Shh.

*Material y
métodos*

1. Animales

1.1. Embriones de pollo

Los huevos fecundados de gallina se obtuvieron de la granja Santa Isabel (Córdoba). Estos huevos se incubaron durante las horas deseadas en una estufa a 37°C, saturada de humedad y con volteo. El estadio de desarrollo de los embriones se estableció de acuerdo con la clasificación de Hamburger y Hamilton (1951).

1.2. Embriones de pez medaka

Los embriones de pez medaka se obtuvieron a partir de cruces de adultos silvestres de la cepa cab de *Oryzias latipes* mantenidos en un sistema con circulación constante de agua, a 28°C y con ciclos de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad. Los embriones recogidos se incubaron en una estufa a 28°C durante el tiempo deseado en medio yamamoto 1X (20 mM NaCl; 0,4 mM KCl; 0,3 mM CaCl₂; 0,5 mM MgCl₂·6H₂O; 0,2 mM NaHCO₃ y pH 7,3), de 1 a 5 días y se clasificaron según los criterios establecidos en Iwamatsu (2004).

1.3. Embriones de ratón

Los ratones utilizados para el análisis de los patrones de expresión de Sox5 y Sox6 son de la cepa C57Bl6 procedentes del animalario del Instituto Cajal. Los estadios de desarrollo se determinaron tomando como 0,5 dpc el día en el que se detectaba el tapón vaginal.

2. Construcciones y oligonucleótidos utilizados

2.1. Microinyección en medaka

2.1.1. Sobre-expresión de Sox5

Con el fin de obtener altos niveles de expresión de la proteína de Sox5 en los embriones de pez medaka se inyectó el ARNm de Sox5 de pez cebra. Para ello se partió de ADNc completo de Sox5 de pez cebra (NM_001033585) clonado en el vector de expresión pCS2+ (DrSox5-EGFP-pCS2+). Este molde se linearizó y, a partir de él, se sintetizó el ARNm utilizando el kit “Capped Transcription Reaction Assembly SP6 Machine Synthesis” de Ambion (TX, USA). Antes de ser microinyectado el ARNm se purificó usando “GFX Mini RNA Purification Kit” de GE Healthcare o “RNA Purification kit” de Qiagen. El ARNm se inyectó en embriones de medaka en estadio de dos células a concentraciones de 50 ng/μl, 100 ng/μl y 150 ng/μl y se dejaron crecer durante un tiempo máximo de 5 días (Fig. 6).

Tabla 2. Lista de oligonucleótidos utilizados.

SECUENCIA (5'-3')	NOMBRE	5'/3'	APLICACIÓN	ESPECIE
gggTCTTACCTGTTTCAAAGTCTCAAAGCGGA	Sox5-T1 Fwd	Top	EMSA	Ratón
gggTCCGCTTTGGAGACTTTGAAACAGGTAAGA	Sox5-T1 Rev	Bottom	EMSA	Ratón
gggCTGCGCTTTTGATAAGGTCTCTGGCAACTCAG	Sox5-T2 Fwd	Top	EMSA	Ratón
gggCTGAGTTGCCAGGACCTTATCAAAGCGCAG	Sox5-T2 Rev	Bottom	EMSA	Ratón
gggGCTCGCGCTTTGAAGTGACAGTTAAATC	Sox5-T3 Fwd	Top	EMSA	Ratón
gggGATTTAAGTGTGACCTTCAAAGGCGCGAGC	Sox5-T3 Rev	Bottom	EMSA	Ratón
gggGCTTTGATGTGCGGGGCGGCGCTTTGAAG	Sox5-T4/T5 Fwd	Top	EMSA	Ratón
gggCTTCAAAGCGCGCCCGCACATCAAAAGC	Sox5-T4/T5 Rev	Bottom	EMSA	Ratón
gggCTTTAAAGTTTGAAGATCAAAGCCTCTAA	Sox5-T6 Fwd	Top	EMSA	Ratón
gggTTAGAGGCTTTTGATCTTCAAACCTTTTAAAG	Sox5-T6 Rev	Bottom	EMSA	Ratón
gggGATTTCGCCCTTTGAAAAAGCTGCGTCGGAT	Sox5-T7 Fwd	Top	EMSA	Ratón
gggATCCGACGACGCTTTTCAAAGGCGAAATC	Sox5-T7 Rev	Bottom	EMSA	Ratón
gggTTACTTTCTTGCTTTGATGTTGGGTAGATC	Sox5-T8 Fwd	Top	EMSA	Ratón
gggGATCTACCCCAACATCAAAGCAAGAAAGTAA	Sox5-T8 Rev	Bottom	EMSA	Ratón
gggTGATTGGGATGGTTTGATGATTCTATGTC	Sox5-T9 Fwd	Top	EMSA	Ratón
gggGACATAGAAATCATCAAACCATCCCAAATCA	Sox5-T9 Rev	Bottom	EMSA	Ratón
gggCCTCTCTTTGGATTACTTTGCCCTGGGCTC	Sox5-T10 Fwd	Top	EMSA	Ratón
gggGAGCCAGGGCAAAGTAATCCAAAGAGAGGG	Sox5-T10 Rev	Bottom	EMSA	Ratón
gggAAGGTAGGAACGTGTTTGATTTGATGAGGG	Sox5-T11 Fwd	Top	EMSA	Ratón
gggCCCTCATCAAAATCAAACACGTTCTCTACCTT	Sox5-T11 Rev	Bottom	EMSA	Ratón
gggTCCGCAAGGAGTGCAGCGGATCAATGG	Sox5-T12 Fwd	Top	EMSA	Ratón
gggCCATTGATCCGCTGGCGCACTCCTTGCGBA	Sox5-T12 Rev	Bottom	EMSA	Ratón
gggCCTCCTTAGTTTGATCCTTCCCTGGCTAGG	Sox5-T13 Fwd	Top	EMSA	Ratón
gggCCTAGCCAGGGAAGGATCAAACTAAGGAGG	Sox5-T13 Rev	Bottom	EMSA	Ratón
CCTCCCCAAAGCAGAAACC	Axin2 T6/T13 Rev	Rev	ChIP	Ratón

CCCTCCTTAGTTTGATCC	Axin2 T6/T13 Fwd	Fwd	ChIP	Ratón
GGAAGGTTGTGCTTACACC	Axin2 T7/T8 Fwd	Fwd	ChIP	Ratón
GGGTATTGATCTAATCAAAAACC	Axin2 T7/T8 Rev	Rev	ChIP	Ratón
CCATGAAGTTCACCCACAGG	Axin2 N1 Fwd	Fwd	ChIP	Ratón
GAGGGATGCTGAACCTGAAC	Axin2 N1 Rev	Rev	ChIP	Ratón
GGTGCAATCGACCCAGACC	Axin2 T6/13 Fwd2	Fwd	ChIP	Ratón
CCAGTTCACCTAAGTAGAGGC	Axin2 T6/13 Rev2	Rev	ChIP	Ratón
CCATCTGCAGCTCTTGTAGC	Axin2 N2 Fwd	Fwd	ChIP	Ratón
CCTTCAAGGATCCTGAGC	Axin2 N2 Rev	Rev	ChIP	Ratón
GGAAGGTTGTGCTTACACC	AXIN2-T7/T8	Fwd	ChIP	Ratón
GGGTATTGATCTAATCAAAAACC	AXIN2-T7/T8	Rev	ChIP	Ratón
GGTACCTAGTTTGATCTTTCCGTGC	Axin2-KpnI-A Fwd	Fwd	Clonaje	Humano
GCTAGCAGTTTGGGATTCTTGGCACAGG	Axin2 NheI Fwd	Fwd	Clonaje	Humano
TAAAGCTTGTCAGCAGGGGGCTCATCTG	Axin2-Hind III Rev	Rev	Clonaje	Humano
TCTCAGCTCTCTCGCATGCTTTGAAGAGCATGCTCTCCCCTGAG	Axin2- Mut SOX		Mutagénesis T13	Humano
TCTCAGCTCTCTCGCATGCTACGCGTAGCATGCTCTCCCCTGAG	Axin2-Mut Tcf		Mutagénesis T6	Humano
TACGCCAGTGACAACGAGAACC	olSox5-5'1 Fwd	Fwd	Ribosonda	Pez medaka
CTGACTGGCTGACTTCACCTCG	olSox5-3'1 Fwd	Rev	Ribosonda	Pez medaka
AATCGATGCCCTTATGGCTACTCAAG	βCatMyc-Clal Fwd	Fwd	Clonaje	
CCGGGGATGGTGATGGTGATGATG	βCatMyc-Smal Rev	Rev	Clonaje	
GATCCTCAGAAAGGGAGGGGCTTTGGAAAGTGCCTGAGCATGCTCACTGAGCCTGAGCTACCTCC	Control2Mo Fwd	Fwd	Clonaje	Pez medaka
CATGGGAGGTAGCTCAGGCTCAGTGAGCATGCTCAGGCACCTTCCAAAGCCCTCCCTTTCTGAG	Control2Mo Rev	Rev	Clonaje	Pez medaka
AGCGGCCGCTATTCTACTGCTTTAG	Bcl2-Not1-2 Rev	Rev	Clonaje	Humano
ATGAATTCTCCTCTGGGAAATATGGC	Bcl2-EcoRI-2 Fwd	Fwd	Clonaje	Humano
AACTCGAGATGCAGATCAATGCTAACG	cShh-XhoI Rev	Rev	Clonaje	Pollo
TACCCGGGTATCAAGGTGTTTTAGAGG	cShh-Smal Fwd	Fwd	Clonaje	Pollo

	zfSox5-S2 Rev	Rev	Clonaje/Ribosonda	Pez cebra
GGTAAGGTTCACTGCATCCCG				
GCTTACTGAGCCTGAGCTTCC	zfSox5-S2 Fwd	Fwd	Clonaje/Ribosonda	Pez cebra
CGCTCCGTCTCTCTCGACAGCAACA	MoSox5-1		Morfolino 1	Medaka
GAGGTAGCTCAGGCTCAGTGAGCAT	MoSox5-2		Morfolino 2	Medaka
CCCTCCGTGTCTGTGCGAGACCAACA	MoSox5-Control		Morfolino control	Medaka
CAGGAGGATGCCTAATTGTG	mDct S415-1	Fwd		
GACTTCCAGTGGTCAATA	mDct S415-2	Rev		
CAACTCCAATATCAGCAAGATA	Sox5-RFPRNAi-1		shARN	Pollo
CCAGAGCACTTACGGCATCAAA	Sox5-RFPRNAi-2		shARN	Pollo

2.1.2. Morfolinos

En los ensayos de bloqueo de función se utilizaron tres oligonucleótidos antisentido tipo morfolino diferentes: uno de ellos (Mo1) reconoce una secuencia de 22 pb de la región 5'UTR de Sox5 de medaka, otro (Mo2) reconoce 22 pb a partir del inicio de la transcripción de medaka y el tercero es un morfolino control (MoCo) que presenta 5 bases desapareadas con respecto al Mo1 (Tabla1). El diseño se realizó mediante la herramienta disponible en la página web de Gene Tools, LLC (Philomath, OR, USA). Los morfolinos se inyectaron en embriones de pez medaka en estadio de dos células a concentraciones de 100 μ M, 150 μ M y 250 μ M (Fig. 6).

2.1.3. Construcción control de la actividad bloqueante de los morfolinos

Con el fin de poder determinar la eficacia con la que los morfolinos bloquean la expresión de Sox5 se generó una construcción que contiene un oligonucleótido de 56 pares de bases (Tabla2) con 32 pares de bases de la región 5'UTR de olSox5, el ATG de inicio de transcripción y 23 pares de bases más, todo ello fusionado a EGFP en el vector pCS2+, 5'UTR-olSox5-pCS2+.

2.2. Electroporación en embriones de pollo

2.2.1. Sobre-expresión de Sox5

Para expresar la proteína de Sox5 en el tubo neural de embriones de pollo se utilizó una construcción que contiene la secuencia completa de la isoforma larga de Sox5 de pollo (GeneBank AJ626989) que codifica para 772 aminoácidos insertada en el vector pCIG (Niwa *et al.*, 1991). Se trata de una construcción bicistrónica basada en el vector pCAGGS que contiene el promotor de la β Globina de pollo, una región IRES y, como reportero, la proteína verde fluorescente EGFP (del inglés Enhanced Green Fluorescent Protein). Como control se utilizó el vector pCIG vacío.

2.2.2. Bloqueo de la expresión de Sox5

Para los análisis de falta de función de Sox5 se partió de dos fragmentos de 22 nucleótidos de la secuencia de Sox5 de pollo clonados en el vector pRFPRNAi (Tabla 2). Este vector contiene el promotor U6 de pollo que dirige la expresión de un operón modificado de un microARN de pollo y bloquea la transcripción del ARNm. Como reportero contiene dsRFP (Sox5-RFPRNAi; Das *et al.*, 2006). Como control se utilizó una secuencia diana de la región codificante de la luciferasa en el mismo vector llamada MiLuc.

Asimismo, se utilizó una construcción cuya secuencia de Sox5 contiene una mutación puntual en el dominio HMG (Sox5^{M569I}) en el vector pCIG (Sox5^{M569I}-pCIG). Esta

mutación es equivalente a la M64I descrita en la proteína Sry de humanos que tiene como consecuencia la reversión sexual (Murphy *et al.*, 2001) y la alteración en el ángulo de torsión del ADN que se provoca tras la unión del HMG al ADN.

2.2.3. Sobre-expresión de β -catenina

Se utilizó una forma mutante de β -catenina en la cual la serina 33 está cambiada por tirosina, de manera que se impide la fosforilación (S33Y) que la marca para degradación y, funciona así, como una forma constitutivamente activa, en el vector pCIG (β -catenina^{CA}).

2.2.4. Rescate de muerte celular

Con el fin de realizar ensayos de rescate de muerte celular electroporamos una construcción codificante para la proteína antiapoptótica Bcl2 humana en el vector de expresión pCDNA3 (Cayuso *et al.*, 2006).

2.2.5. Ensayos de actividad luciferasa.

Se utilizaron varias construcciones de diferentes tipos:

- Reporteros transcripcionales de actividad luciferasa: las construcciones utilizadas en los análisis de actividad transcripcional de Axina2 contienen las regiones reguladoras del gen de Axina2 de humano (AC00485) clonados antes del gen reportero de luciferasa en el vector pGL3basic (Promega, Madison, WI). Las construcciones del primer intrón de Axina2 larga (Axina2L), y la mutada (Axina2L T7*), contienen la región de las posiciones 1078 a 5 en relación con el inicio de transcripción. Las construcciones de Axina2 cortas (Axina2C) y la mutada (Axina2C T7*) contienen el fragmento que comprende de la posición 181 a la 5. Todas las construcciones anteriores proceden del laboratorio de E. Fearon (Leung *et al.*, 2002).

Sobre la construcción Axina2L se realizó mutagénesis dirigida para introducir 8 mutaciones puntuales en los sitios de unión T6 y T13. Para ello se utilizaron los oligonucleótidos Axina2MutSox y Axina2MutTcf (Tabla 1) y se utilizó el “QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit” (Stratagene). Todas las construcciones reporteras se electroporaron a 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

- Construcciones a ensayar: pCIG, Sox5-pCIG, Sox5^{M569I}-pCIG y β -catenina^{CA}-pCIG se electroporaron a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.
- Reporteros de control de actividad luciferasa: pCMV-Renilla a 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y SV40-Renilla electroporado a 0.03 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

3. Microinyección en embriones de pez medaka

Los ensayos de exceso y falta de función en embriones de pez medaka se realizaron inyectando las construcciones anteriormente descritas en embriones de estadio de una o dos células. Estos experimentos se llevaron a cabo utilizando un microinyector IM300 de Narishige con una presión de inyección de 450-580 hPa y una presión de mantenimiento constante de 70-120 hPa (Fig.1). Por otro lado, los estudios de sobre-expresión se realizaron inyectando concentraciones de 50, 100, 200 y 250 ng/ μ l del mRNA de Sox5 de pez cebra en el vector pCS2+ (DrSox5-pCS2+) junto con el colorante vital Fast Green al 0,1%. Como control se inyectó el ARNm de EGFP obtenido a partir del plásmido EGFP-pCS2+ a las mismas concentraciones.

Para los análisis de falta de función se inyectaron oligonucleótidos antisentido tipo morfolino (Mo1 y Mo2 por separado o juntos) y el morfolino control (MoCo). En primer lugar, se coinyectaron los morfolinós con la construcción control 5'UTR-OISox5-EGFP-pCS2+ para determinar la concentración necesaria para disminuir la expresión de EGFP sin afectar a la viabilidad del embrión. Se probaron las concentraciones de 100 μ M, 150 μ M y 250 μ M.

En ambos tipos de experimentos los embriones se dejaron crecer durante un período máximo de cuatro días en un incubador a 28°C en medio yamamoto 1X y, posteriormente, fueron procesados para hibridación *in situ*, inmunohistoquímica o *western blot* (Fig.6).

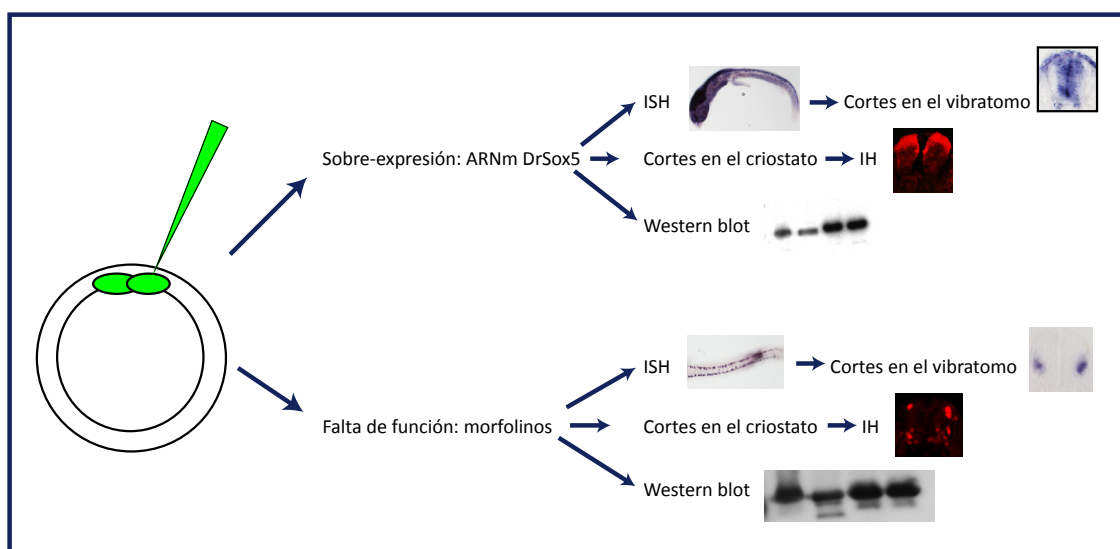


Fig. 6. Microinyección en embriones de pez medaka. Inyección en estadio de dos células para realizar experimentos de exceso y falta de función analizados mediante hibridación *in situ*, inmunohistoquímica y *western blot*.

4. Electroporación *in ovo*

Las construcciones anteriormente descritas se inyectaron en el lumen del tubo neural a una concentración de 1-2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ con Fast Green al 0,5% y MgCl_2 1mM para poder seguir así el curso de la inyección. Inmediatamente después se colocaron los electrodos en paralelo a ambos lados del tubo neural y, utilizando un electroporador Intracell Ovodynde TSS20, se aplicó un tren de 5 pulsos de 14 voltios y 50 ms de duración a un intervalo de 300 ms. Los electrodos de platino se encuentran a 2 mm de separación, son de 0,4 mm de diámetro y su longitud expuesta es de 1,5 mm. Tras la electroporación el embrión se cubrió con PBS, se selló el huevo y se devolvió al incubador durante 24-48-72h. Los embriones se procesaron para ensayos de luciferasa, hibridación *in situ*, inmunohistoquímica, coimmunoprecipitación y *western blot* (Fig. 7).

5. Ensayos de actividad transcripcional con luciferasa

Para analizar la regulación de la transcripción de *Axina2* se electroporaron las

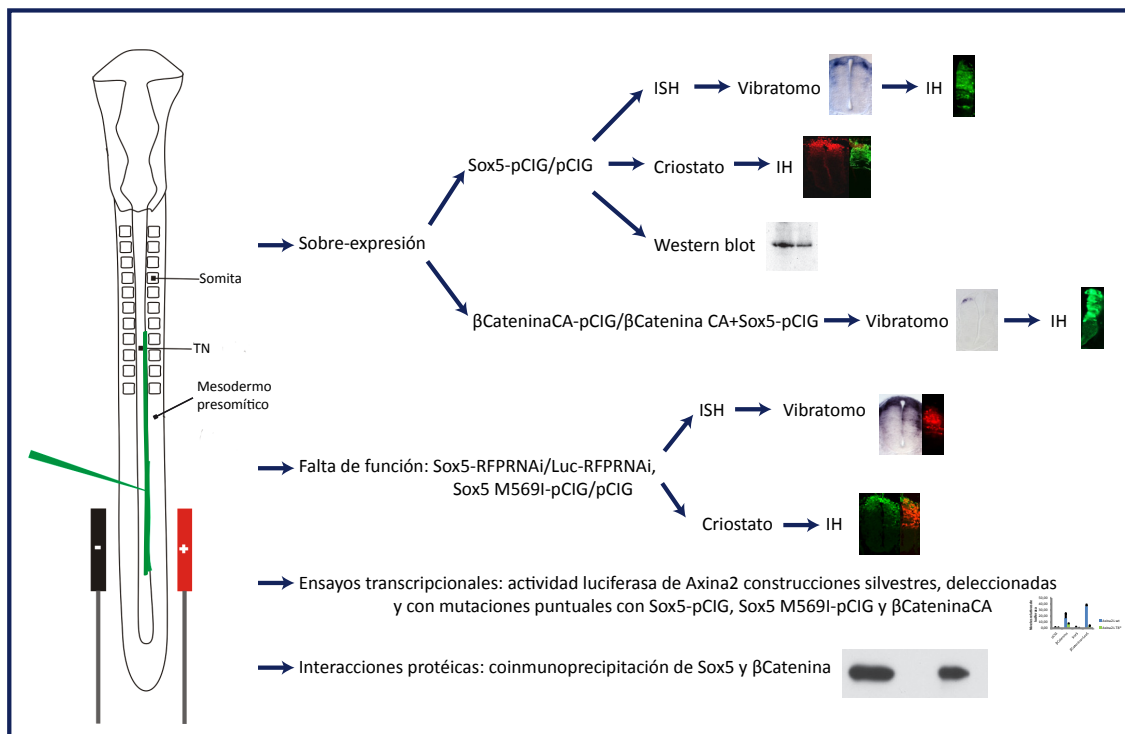


Fig. 7. Experimentos de electroporación en el tubo neural de embriones de pollo. Experimentos de exceso y falta de función analizados mediante hibridación *in situ*, inmunohistoquímica y *western blot*, análisis de actividad transcripcional y detección de interacciones proteicas.

distintas construcciones en la zona caudal del tubo neural en embriones de pollo de estadio HH10-HH11. 24 horas tras la electroporación se diseccionaron los trozos de tronco de embriones electroporados y se disgregaron en tampón de lisis en un bloque térmico en agitación a 24°C y 600 rpm durante 30 minutos. Posteriormente se terminaron de lisar las células pipeteando con puntas de 200 µl y se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 minutos. La actividad luciferasa se midió utilizando el kit “Dual-Luciferase Reporter Assay System” de Promega con 20 µl de sobrenadante y 20 µl de cada uno de los reactivos (LAR Buffer y Stop and Glow). La determinación de las actividades se hizo utilizando un luminómetro de tubo Sirius (Berthold) y el FB12 Sirius Software. Las medidas se tomaron durante un período de 10s.

A la actividad luciferasa de los embriones electroporados con el control pCIG se le asignó el valor arbitrario de 1. La actividad en presencia de β -catenina-pCIG, Sox5-pCIG y Sox5^{M569I}-pCIG se calculó relativizada a la actividad de pCIG. El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante ANOVA en el software IBM SPSS Statistics 20 y en las gráficas se representó la media de cada tratamiento y la desviación estándar. Con * se representó $p < 0.05$ y con ** $p < 0.05$.

6. Hibridación *in situ* en embriones completos

6.1. Embriones de pollo y ratón

Para los experimentos de hibridación *in situ* los embriones se disecaron en PBS frío y se fijaron durante toda la noche a 4°C en paraformaldehído (PFA) al 4% y se siguió el protocolo estándar de hibridación *in situ in toto* (Perez-Alcala *et al.*, 2004). Las ribosondas usadas: GgMsx1, GgSox6, GgSox5, GgShh, GgVitronectina, GgFoxA2, GgDbx1, GgDbx2, GgAxina2, GgCash1, GgCath1, GgNgn1, MmSox5 y MmSox6 se han descrito en (Martinez-Morales *et al.*, 2010; Perez-Alcala *et al.*, 2004). La hibridación de las ribosondas se hizo a 58°C durante toda la noche y se utilizó el anticuerpo anti-digoxigenina (Roche) a una dilución 1:2000. La reacción de revelado se llevó a cabo en condiciones de oscuridad utilizando el reactivo NBT-BCIP (Roche). En las hibridaciones *in situ* dobles una de las sondas se marcó con digoxigenina-UTP y la otra con fluoresceína-UTP, las sondas se detectaron utilizando anticuerpos anti-digoxigenina y anti-fluoresceína y revelando con NBT-BCIP (Roche) e INT/BCIP (Roche).

Para un análisis detallado en el eje dorso-ventral, los embriones fueron incluidos en 5% agarosa-10% sacarosa y seccionados a 40 µm (vibratomo Leica VT1000S). Los embriones y las secciones se fotografiaron con una cámara digital Nikon DS-U1 acoplada

a un microscopio Nikon Eclipse80i.

6.2. Embriones de pez medaka

Para los ensayos de hibridación *in situ* los embriones se fijaron durante toda la noche a 4°C en PFA al 4%, posteriormente se decorionaron manualmente y se siguió el protocolo estándar de hibridación *in situ in toto* (Lopez-Rios *et al.*, 2008). Las ribosondas *OLSox5*, *OLSox9a*, *OLSox9b*, *OLPax2*, *OLIslet1/2*, *OLLhx5*, *OLShh*, *OLPax6*, *OLPax7*, *OLSfrp2*, *OLEn2* y *OLSnail2* se han descrito en (Klüver *et al.*, 2005; Lopez-Rios *et al.*, 2008; Ruiz *et al.*, 2009). La hibridación se hizo a 65°C durante toda la noche y se utilizó el anticuerpo anti-digoxigenina (Roche) a una dilución 1:2000. La reacción de revelado se hizo en condiciones de oscuridad utilizando el reactivo NBT-BCIP (Roche). Para un análisis detallado en el eje D-V, los embriones fueron incluidos en 49% gelatina-30% BSA (Bovine Serum Albumin)-20% sacarosa y seccionados a 40 µm (vibratomo Leica VT1000S). Los embriones y las secciones se fotografiaron con una cámara digital Nikon DS-U1 acoplada a un microscopio Nikon Eclipse80i.

7. Inmunohistoquímica

Los embriones se disecaron en PBS 1X y se fijaron a 4°C en 4% PFA durante 2h (embriones de pollo de HH14-15 y los de ratón) y 4h (embriones de pollo de HH25 y los de medaka). Posteriormente se incluyeron en bloques de gelatina 7,5%- sacarosa 15% y se congelaron a -65°C con isopentano. Se obtuvieron secciones de 10-15 µm de grosor en un criostato Leica CM1900. Se utilizó el protocolo para inmunohistoquímica descrito en Martínez-Morales *et al.*, (2010). Los anticuerpos primarios y secundarios se utilizaron a las concentraciones descritas en la Tabla 3.

En el caso de los embriones electroporados y analizados por hibridación *in situ*, para visualizar la proteína EGFP se realizó inmunohistoquímica en secciones en flotación (Martínez-Morales *et al.*, 2010). Los embriones se incluyeron en agarosa 5%-sacarosa 10% en agua y se seccionaron a 40 µm en un vibratomo Leica VT1000S. Las secciones se recogieron en PBS y se permearon 10 minutos en PBT (PBS1x, 1% tritón X100). El bloqueo se realizó durante 30 minutos en PBT con 10% de suero fetal de ternera (FCS) y se incubaron con el anticuerpo RbαEGFP (Tabla 3) durante toda la noche a 4°C. Finalmente las secciones se lavaron con PBT y se incubaron con el anticuerpo secundario αRb-Alexa488 durante dos horas a temperatura ambiente. Tras la inmunohistoquímica las secciones se montaron en glicerol 50%-PBS 50% con thimerosal al 0,1% para su análisis. Las secciones se fotografiaron con una cámara digital Nikon DS-U1 acoplada al microscopio Nikon Eclipse80i. En los embriones electroporados con las construcciones Sox5-RFPRNAi y Luc-RFPRNAi no fue necesario realizar inmunohistoquímica tras los cortes en el vibratomo para poder detectar la señal de DsRed.

Tabla 3. Lista de anticuerpos utilizados.

Anticuerpo	Casa comercial	Dilución					
		Pollo	Ratón	Medaka	Células	CoIP/ChIP	WB
α MoMsx1	Hybridoma Bank	1/1000	1/500				
α MoPax6	Hybridoma Bank	1/2000					
α MoPax3	Hybridoma Bank	1/1000	1/1000				
α MoPax7	Hybridoma Bank	1/50	1/50				
α MoLmx1	Hybridoma Bank	1/500					
α MoBrn3a	Chemicon	1/500					
α Moislet 1/2	Hybridoma Bank	1/1000		1/1000			
α MoLim2	Hybridoma Bank	1/500					
α MoEvx1	Hybridoma Bank	1/1000					
α MoEn1	Hybridoma Bank	1/500					
α RbSox5	Laboratorio	1/3000	1/1000			1/50	1/5000
α GoSox5	Laboratorio M. Wegner					1/50	
α RbPax2	Zymed/Invitrogen	1/500					
α MoHuC/D	Molecular Probes	1/1000		1/1000			
α MoNkx6.1	Hybridoma Bank			1/1000			
α MoPH3	Millipore			1/1000			
α Mo β Catenina	AbCam						
α Mo β Catenina	BD					0,75 μ g	1/4000
α MoTubulina	Promega						1/1000
α MoAp2	Hybridoma Bank		1/500				
α MoHA	Sigma Aldrich				1/1000		1/100
α RbHA	Sigma Aldrich				1/500	0,75 μ g	1/500
α RbFlag	Sigma Aldrich				1/500	1,2 μ g	1/500
α MoMyc	Sigma Aldrich				1/1000		1/1000
α RbMyc	Sigma Aldrich					0,75 μ g	1/1000
α MoT7	Novagen					1/50	
α RbEGFP	Molecular Probes	1/1000					1/1000
α Mo Alexa488	Invitrogen	1/2000	1/2000				
α Mo Alexa594	Invitrogen	1/2000	1/2000				
α Rb Alexa488	Invitrogen	1/2000	1/2000				
α Rb Alexa594	Invitrogen	1/2000	1/2000				
α Mo Alexa647	Invitrogen	1/2000					
α Mo Alexa405	Invitrogen	1/2000					
α Rb Pacific blue	Invitrogen	1/2000					
α RbCy3	Jackson	1/1000					
α RbCy2	ImmunoResearch						
	Jackson	1/1000					
	ImmunoResearch						
α Digoxigenin-AP	Roche	1/2000	1/2000	1/2000			
Proteína A HRP	Invitrogen						1/3000
α RbPOD	Invitrogen						1/1000000
α MoPOD	Invitrogen						1/250000

8. Western blot

8.1. Western blot de embriones de pez medaka

Tanto los embriones silvestres como los microinyectados (lotes de 20 huevos de estadio 20) se recogieron en medio yamamoto 1X frío. Posteriormente se retiró el medio y los embriones se congelaron en seco a -80°C . Para los *western blot*, los embriones se descongelaron en hielo, se añadió tampón Laemmli 5x (60 mM Tris HCl pH 6,8; 2% SDS; 10% glicerol; 5% β -Mercaptoetanol y 0,01% azul de bromofenol) y se disgregó el tejido utilizando un émbolo. Las proteínas se desnaturalizaron calentando durante 5 minutos a 95°C y, posteriormente se cargaron 10 μl de cada muestra en un gel de SDS-Poliacrilamida al 12%. Las proteínas se separaron en el gel desnaturalizante y se transfirieron a una membrana de PVDF (Immobilion-P Membrane, Millipore) para su análisis por *western blot*. Las membranas se incubaron con distintos anticuerpos a las diluciones especificadas en la Tabla 3 en una solución de PBT con 5% de leche en polvo desnatada. Para el revelado se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa, el kit de detección ECL Advance (Amersham) y exposición autorradiográfica con películas de GE Healthcare. El análisis cuantitativo se obtuvo mediante densitometría (Densitómetro GS-800) relativizando la cantidad de proteína a la de la α Tubulina.

8.2. Western blot de embriones de pollo

Los embriones silvestres o electroporados se recolectaron en PBS 1x frío y se prepararon extractos con el tampón NP40/RIPA (150 mM NaCl; 50mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 2% NP-40; 0,5% deoxicolato y 100 mg/ml aprotinina). En cada caso se usó 20 μg del peso de las muestras. La electroforesis e inmunodetección se realizó como en el caso de los embriones de medaka.

9. Coinmunoprecipitación (CoIP)

9.1. Transfección en cultivos de líneas celulares

Para los ensayos de coinmunoprecipitación (CoIP) se utilizaron embriones de pollo electroporados con Sox5-pCIG (descrito anteriormente) o cultivos de la línea celular HEK 293 transfectados. Las células se cultivaron en placas de 6 pocillos con cristalitos recubiertos con polilisina 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y medio DMEM con GlutaMAX (Invitrogen) y 10% de FCS. Con el reactivo “FuGene HD Transfection Reagent” de Roche se transfectó 1 μg de cada construcción (Sox5-HA-pCDNA3, Sox6-Flag-pCDNA3, β -catenina-Myc-pCDNA3 y pCDNA3) y con un total de 2 μg de ADN en cada pocillo en células al 80% de confluencia.

9.2. Coinmunoprecipitación

Las células se recogieron 48 horas después de la transfección y se lisaron utilizando 200 µl de tampón de lisis en cada pocillo (150 mM NaCl; 1% NP-40; 50 mM Tris HCl pH 8; 10 µg/ml aprotinina; 10 µg/ml leupeptina y 100 µg/ml PMSF), las muestras se agitaron durante 1h a 4°C y se centrifugaron para descartar el pellet. Para la IP se utilizaron bolitas de proteína G sefarosa (Sigma Aldrich) lavadas con agua y NP-40 e incubadas con 30 µl de cada una de las muestras a 4°C durante 1 hora en agitación, se retiró el sobrenadante y se descartó el pellet.

De cada muestra se tomaron 60 µl del sobrenadante clarificado y se llevaron a un volumen final de 200 µl con tampón de lisis con inhibidores de proteasas y se añadió 3 µl del anticuerpo correspondiente: 0,75 µg de Mo/RbαHA, Mo/RbαMyc y MoαβCatenina y 1,2 µg de Mo/RbαFlag (Tabla 3). Las muestras se incubaron a 4°C en agitación durante toda la noche. Se añadieron entonces 60 µl de proteína G en tampón NP-40 y se incubaron en agitación durante 1h 30 minutos a 4°C, el pellet se recogió tras una centrifugación, y se lavó con tampón de lisis completo 3 veces. Tras el último lavado se añadió a cada muestra 35 µl de tampón SDS-Laemmli 2x (0,5 M Tris HCl pH 6,8; 20% glicerol, 10% SDS y 0,1% azul de bromofenol) y se agitó la mezcla con el vórtex. Posteriormente se incubó durante 30 minutos a 95°C y se utilizaron 20 µl de cada muestra para cargarlos en un gel del 12% de SDS-poliacrilamida. La transferencia y detección por *western blot* se realizó según el protocolo descrito en el apartado 8 y se utilizaron los anticuerpos indicados y recogidos en la tabla 3.

10. Ensayo de movilidad electroforética (EMSA)

10.1. Transfección y preparación de extractos celulares

En los EMSA se utilizaron extractos de proteínas procedentes de cultivos celulares de la línea HEK 293 transfectados y cultivados con medio DMEM y 10% FCS en placas de 10 cm. En este caso se introdujo 10 µg de cada plásmido (Sox5-pCIG, Sox5^{M569I}-pCIG y EGFP) mediante el uso de polietilenamina (PEI). Los cultivos celulares se recogieron 48 horas después de la transfección y las células se lisaron con 300 µl de tampón de lisis (ver apartado 10.2) con 10 µg/ml de aprotinina, 10 µg/ml leupeptina y 2 mM DTT, se utilizó un raspador para levantarlas de la placa y se agitaron en el vórtex. Las células se centrifugaron y se recogió el sobrenadante.

10.2. Hibridación de los oligonucleótidos

Para los EMSAs se diseñaron 13 parejas de oligonucleótidos diferentes para cada uno de los posibles sitios de unión de Sox en el locus de Axina2 de ratón (Tabla2). Cada pareja se hibridó utilizando 100 mM KCl y 5 µg de cada oligonucleótido a una concentración de 1 µg/µl. La mezcla se incubó a 95°C durante 5 minutos y se dejó enfriar lentamente. Como control se utilizó la pareja de oligonucleótidos del sitio dimérico C/C' en el promotor del gen de la proteína cero de la mielina (MPZ; Stolt *et al.*, 2006).

10.3. Marcaje de los oligonucleótidos con ³²P-CTP

El marcaje de los oligonucleótidos hibridados se realizó utilizando 2,5 µl de ³²P-dCTP (300 mCi/mmol), 100 ng de los oligos, 2,5 U de enzima Klenow y tampón 2 (New England Biolabs). La mezcla se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. El exceso de ³²P-dCTP se retiró utilizando las columnas "Quick Spin Mini" de Roche y el marcaje final de los oligos se cuantificó en un contador de cuentas con el software QuantaSmart™ y se ajustaron las diluciones para que quedaran a 5000 cpm en 200 µl.

Las mezclas utilizadas para los ensayos contenían 5000 cpm cada una, 1 µg de proteína, 1 µl de oligos, 2 µl de tampón MSB (Mobility Shift Buffer; 100 mM HEPES pH 8, 20 mM DTT, 50 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 250 mM NaCl y 50% glicerina), 1 µg de poliGdC, 3 µg de albúmina de suero bovino (BSA), 5 mM DTT y agua y se incubaron durante 20 minutos en hielo antes de cargarlas en el gel.

10.4. Electroforesis

Se preparó un gel no desnaturante de 5% poliacrilamida y se corrió durante 1h a 120 V antes de cargar las muestras. Después de cargarlas se corrió el gel en tampón TE a 15 mA aproximadamente durante 1 hora. Posteriormente se secó el gel en papel Whatman en un secador de geles de vacío a 80°C durante 40 minutos, se introdujo en un cassette de revelado con una película de autorradiografía y se incubó durante al menos una noche a -80°C antes del revelado.

11. Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

11.1. Transfección

Para los experimentos de ChIP se utilizó la línea celular de melanoma de ratón B16, previamente descrita (Stolt *et al.*, 2008). Cada placa de 10 cm se transfectó con 10 µg de Sox5-T7-pCMV utilizando PEI.

11.2. ChIP

Las células se fijaron con PFA a una concentración final de 0,75% durante 10 minutos a temperatura ambiente, se lavaron con PBS y se separaron de la paca con un raspador. La lisis celular se realizó con tampón A (10 mM TrisHCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8, 5mM MgCl₂ y 0,5% NP-40) con aprotinina y leupeptina, las células se incubaron a 4°C durante 15 minutos y se centrifugaron para recuperar el pellet y resuspenderlo en 250 µl de TES (50 mM TrisHCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8 y 1% SDS). El ADN se fragmentó por sonicación utilizando un Bioruptor (Diagenode S.A.) con dos rondas de 7 minutos de duración y ciclos de 30s *on*/30s *off*. Posteriormente, las muestras se centrifugaron y los pellets se resuspendieron en 300 µl de tampón TE (50 mM TrisHCl pH 8 y 10 mM EDTA pH 8) y se añadió 17 µl de 5 M NaCl para revertir la fijación, incubando durante al menos 4 h a 65°C. Tras la incubación, se añadieron 10 µl de 1 M Tris HCl pH 8, 0,5 µl de EDTA y 1µl de proteinasa K y se mantuvieron en agitación durante 1 hora a 55 °C. Las muestras se centrifugaron, se repartieron en alícuotas y se purificaron usando extracción con fenol/cloroformo/isoamílico y precipitación con acetato sódico 3 M. Los precipitados se resuspendieron en tampón TE con RNasa. Una parte de la muestra se cargó en un gel de agarosa al 2% para comprobar que los fragmentos tuvieran un tamaño aproximado de 300 pb, 15 µl se reservaron para el control de carga inicial y otra parte se utilizó para la inmunoprecipitación (IP).

Antes de la IP las bolitas de proteína A sefarosa (Sigma Aldrich) se bloquearon con 250 µg/ml de espermatozoos de salmón y 250 µg/ml de BSA en tampón TE durante 3 horas en rotación. Tras el bloqueo se lavaron y resuspendieron en TE.

Las muestras se incubaron previamente con 20 µl de proteína A prebloqueada en rotación durante 2 horas a 4°C. Posteriormente se centrifugaron, se recogió el sobrenadante y se separaron tres alícuotas de 150 µl cada una que se organizaron de la siguiente manera :

- 150 µl se incubaron con tampón control. No se le añade nada más.
- 150 µl se incubaron con suero preinmune: 3 µl de MolgG 2µg/µl (Sigma Aldrich).
- 150 µl se incubaron con 3 µl de anticuerpo MoαT7 (Novagen).

Las muestras se mantuvieron en rotación durante 2 horas a 4°C, se añadió 20 µl de proteína A sefarosa prebloqueada y se incubó en rotación a 4°C durante toda la noche. Tras la incubación las bolitas se lavaron una vez en cada uno de los siguientes tampones: TE, tampón de baja salinidad (LSB, 0,1% SDS, 1% Tritón X100 y 2 mM EDTA pH 8), tampón de alta salinidad (HSB, 0,1% SDS, 1% Tritón X100, 2 mM EDTA pH 8, 20mM Tris HCl pH 8 y

500 mM de NaCl), tampón de lavado de ChIP (CWB, 10 mM Tris HCl pH8, 1 mM EDTA pH 8, 250 mM LiCl, 1% NP-40 y 1% SDC) y tampón TE. Finalmente, las muestras se eluyeron en 200 µl de tampón de elución (50 mM NaHCO₃ y 1% SDS).

En los eluidos con los fragmentos de DNA inmunoprecipitados se amplificó por PCR (1µl) la región de 290 pb que contiene los sitios de unión T6 y T13 para poder confirmar la unión de Sox5 al sitio T6/T13. Se empleó 10 pmol de cada oligonucleótido Axina2 T6/T13 Fwd, Axina2 T6/T13 Rev, Axina2 T6/T13 Fwd2 y Axina2 T6/T13 Rev (Tabla2). Como control positivo se utilizaron los oligonucleótidos mDct S415-1 y mDct S415-2 que amplifican el sitio de unión de Sox en la región reguladora de mDct (Stolt *et al.*, 2008) y las parejas Axin2 N1 y Axin2 N2 que se encuentran en la región genómica de Axina2 10 kpb antes del sitio de inicio de transcripción y que no contienen un sitio de Sox5 conservado. Se realizaron 32 ciclos de PCR convencional usando la enzima Taq Polimerasa de New England Biolabs y una temperatura de anillamiento de 56°C.

Resultados

1. Análisis de la expresión de Sox5 en tres modelos de vertebrados

En trabajos previos en el laboratorio se ha descrito la expresión de Sox5 en distintas poblaciones celulares del tubo neural (Martínez-Morales *et al.*, 2010; Pérez-Alcalá *et al.*, 2004). En esta tesis se ha decidido estudiar en más detalle la expresión en los progenitores neurales en el eje D-V y analizar si el patrón de expresión de Sox5 se encuentra conservado entre distintos organismos. De ser cierto esto último, se podrán utilizar distintos modelos de vertebrados en estudios funcionales complementarios.

Los genes Sox pertenecientes a un mismo grupo comparten entre sí la estructura tridimensional de sus proteínas y la organización de sus diferentes dominios. Además existe una gran homología entre las proteínas Sox ortólogas en diferentes organismos y, sobre todo, entre sus dominios HMG (Lefebvre, 2010). Para comprobar la homología existente entre las proteínas Sox5 en distintos organismos se compararon las secuencias de las proteínas de las formas largas de pollo, ratón y pez cebra disponibles en la base de datos Ensembl (www.ensembl.org). Para la secuencia de medaka se obtuvo primero una predicción a partir de su secuencia genómica por comparación con las existentes en diferentes organismos disponibles en la bases de datos de NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) y Ensembl. Posteriormente, se encontró una nueva referencia para el ADNc de Sox5 de medaka (ABU54323 en la base NCBI) que es muy similar a la predicción que teníamos previa y que utilizamos para los siguientes análisis.

A partir de la secuencia de ADNc se obtuvo la secuencia de aminoácidos (aa) de la proteína utilizando el programa ORF Finder (Open Reading Frame Finder) del NCBI. La secuencia resultante se comparó con las de las proteínas de Sox5 de pollo y ratón mediante la herramienta de BLAST del NCBI. El porcentaje de identidad entre las secuencias de pollo y ratón es del 93% (Pérez-Alcalá *et al.*, 2004) y respecto a la de medaka, la identidad desciende a un 60%. Las proteínas de pollo, ratón y pez medaka presentan una longitud similar de 760, 763 y 721 aa respectivamente y, el estudio de los dominios estructurales reveló que se encuentran distribuidos de forma semejante en todas ellas (Fig. 8). Así, la caja HMG está en la misma región en las tres proteínas, de forma que comprenden los aa 533-625 en pollo, 536-625 en ratón y 541-633 en pez medaka. Pudimos distinguir además tres dominios *coiled-coil* muy conservados en pollo, ratón y medaka, y sólo en la proteína de Sox5 de ratón se identificó un dominio *coiled-coil* adicional.

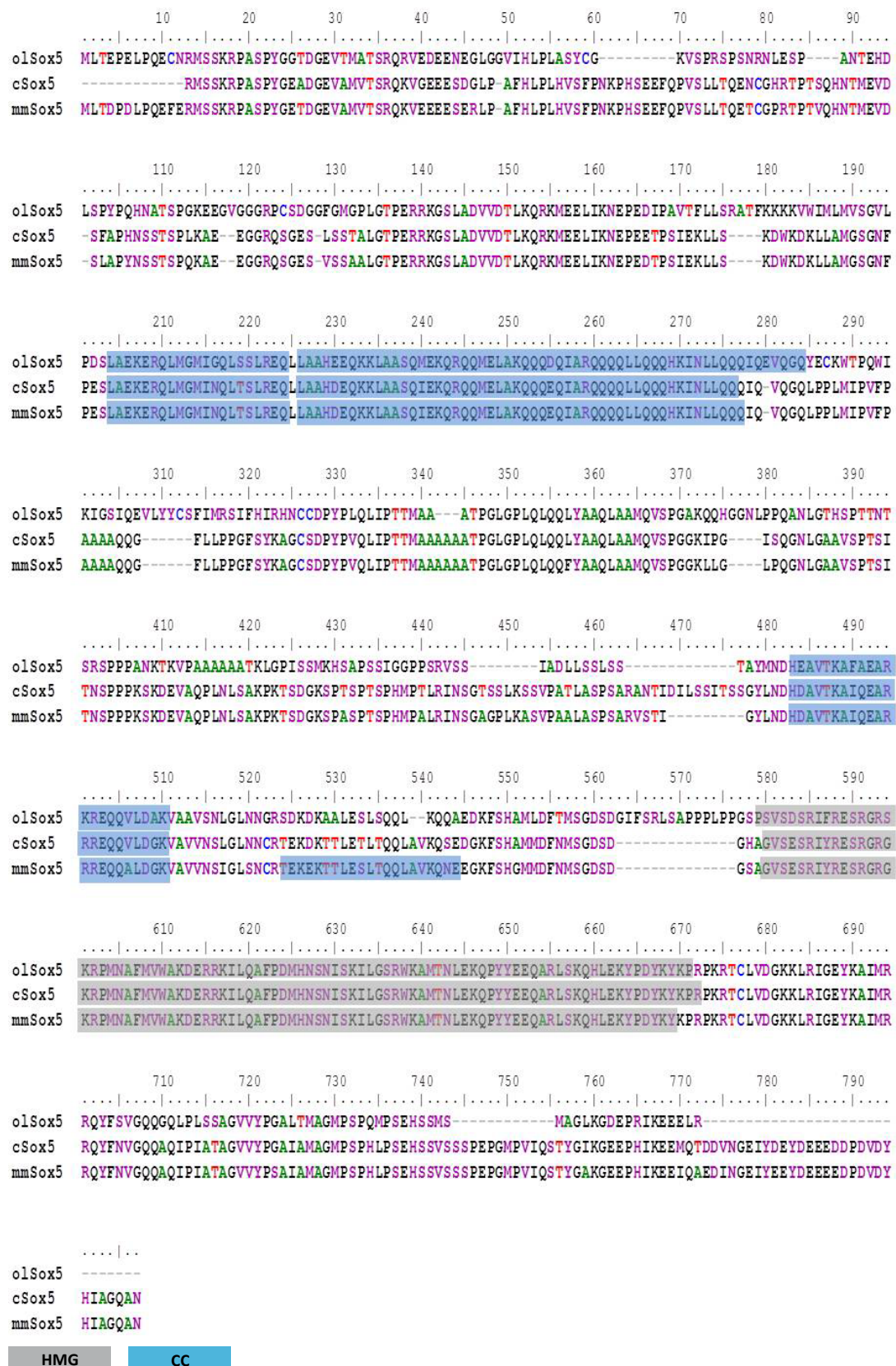


Fig. 8. La organización de los dominios de la proteína Sox5 se encuentra conservada en medaka, pollo y ratón. Alineamiento de las secuencias de las proteínas de Sox5 en medaka (OI Sox5 Ensembl ENSORLP00000011049), pollo (GgSox5 ENSGALP00000021536) y ratón (MmSox5 ENSMUSP00000047567). Las cajas azules corresponden a los dominios coiled-coil y las cajas grises a los dominios HMG, ambos se localizan en posiciones muy parecidas en las tres proteínas.

1.1 Sox5 se expresa de manera regionalizada en los progenitores del tubo neural de pollo

En trabajos previos del laboratorio se había descrito la expresión de Sox5 en las células de la cresta neural, placa del suelo y notocorda a lo largo de todo el eje A-P (Perez-Alcala *et al.*, 2004) en embriones de pollo de estadio de Hamburger y Hamilton HH11 (Hamburger & Hamilton, 1951; 13 somitas) y en progenitores neurales de la zona ventricular en estadios HH14 y HH24 (Martinez-Morales *et al.*, 2010). Con el objetivo de determinar si la expresión de Sox5 está regionalizada a lo largo del eje D-V en el tubo neural comparamos la expresión de Sox5 con la de proteínas de expresión específica en los diferentes dominios de progenitores neurales en embriones de pollo (Fig. 9). Mediante inmunohistoquímica, se observó que en embriones de pollo de estadio de HH14 (22-24 somitas) Sox5 se expresa intensamente en las células de cresta neural (CCN) tanto migratoria como premigratoria (donde coincide con la expresión del marcador de cresta Snail2), en la placa del suelo y, con menor intensidad, en todos los progenitores proliferativos de la zona ventricular del tubo neural (Fig. 10A-C).

Más adelante en el desarrollo, en HH18 (30-36 somitas), la expresión de Sox5 se mantiene en la placa del suelo, CCN premigratoria y parte de los progenitores en la zona ventricular, pero desaparece de los progenitores de motoneuronas (Fig. 10D y datos no mostrados). La expresión es más intensa en los progenitores dorsales que expresan Msx1 y Pax7 (Fig. 10E-H). En estadio de HH20 (40-43 somitas) se observó una disminución de

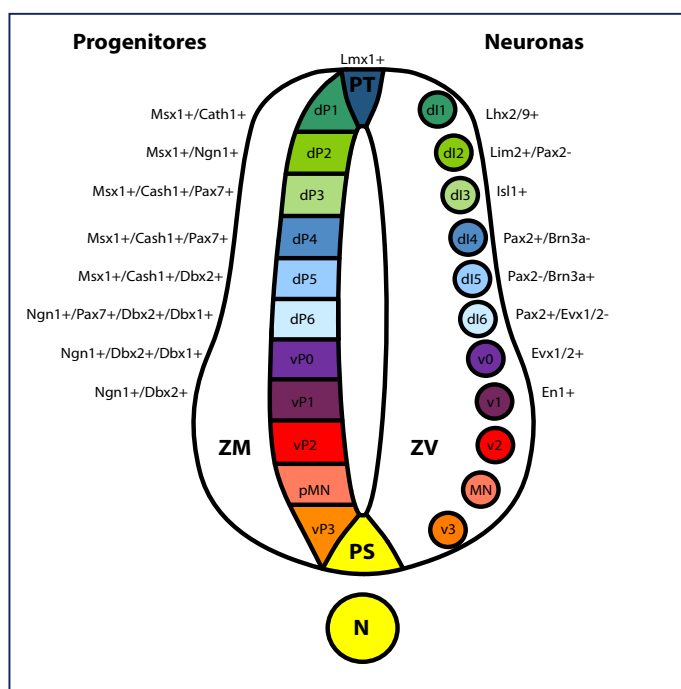
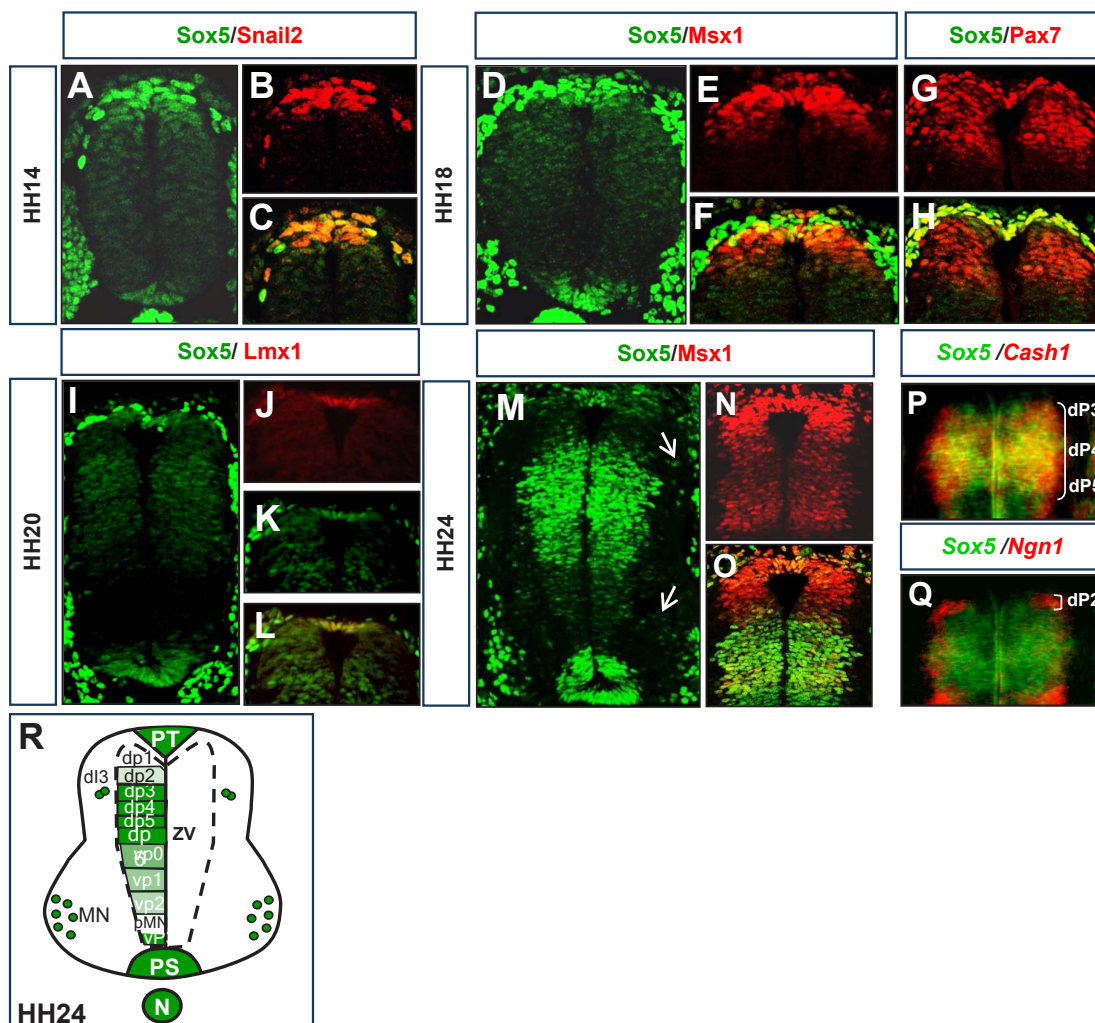


Fig. 9. Esquema del tubo neural. Marcadores utilizados para identificar las diferentes poblaciones de progenitores y neuronas. ZV: zona ventricular, ZM: zona del manto, PT: placa del techo, PS: placa del suelo, N: notocorda.

Fig. 10. Sox5 se expresa en dominios específicos de progenitores dorsales en embriones de pollo. Detección de los distintos marcadores mediante inmunohistoquímica (A-O) e hibridaciones *in situ* dobles (P-Q) en secciones transversales de criostato de embriones de pollo. (A) En estadio HH14 Sox5 se expresa en las células de la cresta neural (CCN), en la placa del suelo y más débilmente en la mayor parte de las células neuroepiteliales. (B,C) Sox5 se coexpresa con Snail2 en las CCN. (D) En estadio HH18 disminuye la expresión de Sox5 en la zona ventral del tubo neural. (E-H) Sox5 se coexpresa con Msx1/2 y Pax7 en los progenitores dorsales. (I-L) En estadio de HH20 Sox5 se expresa en los progenitores dorsales e intermedios así como en las células de la placa del techo, donde coincide con Lmx1. (M-O) Sox5 se expresa en los progenitores neurales dorsales que expresan niveles bajos de Msx1/2 en estadio HH24, en las interneuronas dl3 (flecha) y en una subpoblación de motoneuronas (flecha). (P,Q) Sox5 se coexpresa con *Cash1* en los dominios de progenitores dorsales dp3-dp5 (P) y no se expresa en los progenitores dp2 *Ngn1+*. (R) Dibujo esquemático del tubo neural en el que se representan, en verde, los dominios de progenitores y neuronas que expresan Sox5 en embriones de estadio HH24.



los progenitores del dominio dp2 que expresan *Ngn1* (Fig. 10Q), también detectados por hibridación *in situ*, ni en los más dorsales dp1. Cuando los progenitores salen de ciclo, migran lateralmente hacia la zona del manto del tubo neural y se diferencian en distintos subtipos neuronales; de ellos sólo las interneuronas dl3, *Islet1/2*⁺, y una subpoblación de motoneuronas expresan *Sox5* (Fig. 10M). En conjunto, este patrón regionalizado de expresión de *Sox5* sugiere la posibilidad de que *Sox5* controle la identidad de los progenitores neurales durante el desarrollo del tubo neural.

1.2 Sox5 se expresa en progenitores del tubo neural en embriones de ratón

Con el fin de determinar si la expresión regionalizada de *Sox5* se encuentra conservada evolutivamente, analizamos también su expresión en embriones de ratón y de pez medaka. Puesto que la diferenciación de las células del tubo neural ocurre

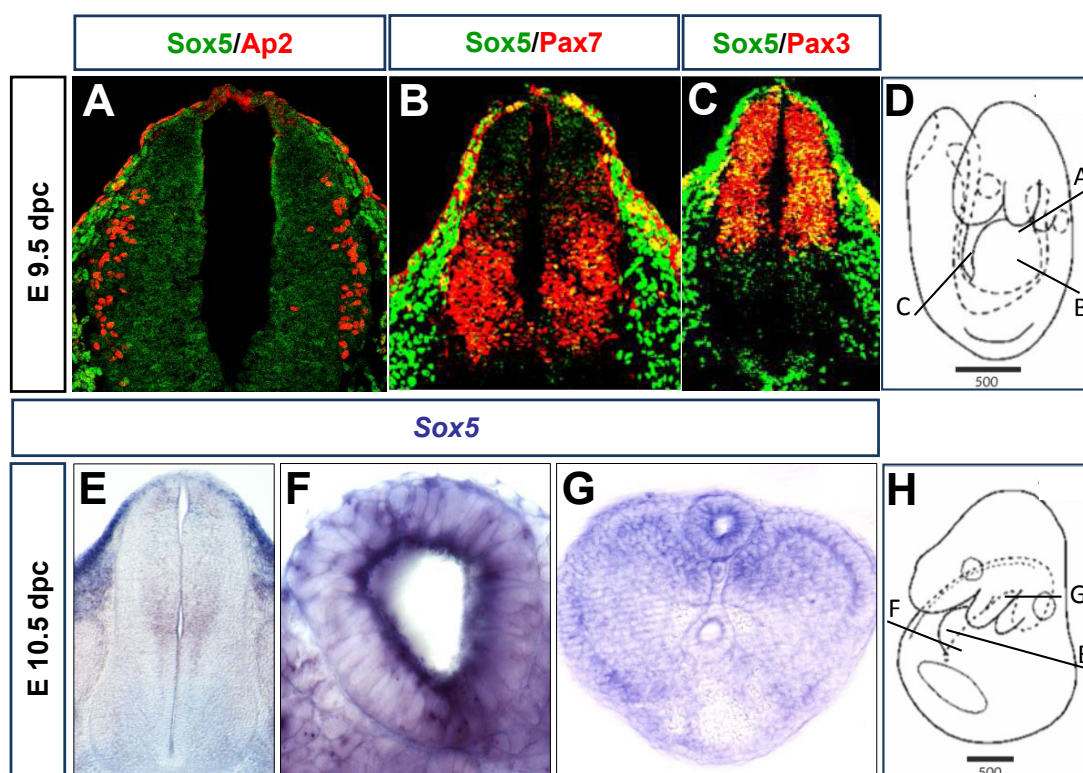


Fig. 11. Sox5 se expresa en progenitores dorsales de embriones de ratón. Análisis de la expresión de *Sox5* y de los marcadores de progenitores dorsales mediante inmunohistoquímica (A-C) e hibridación *in situ* (E-G). (A) En embriones de 9,5 dpc *Sox5* se expresa en las CCN coincidiendo con la expresión de *Ap2* en regiones rostrales. *Sox5* se coexpresa con *Pax7* (B) y *Pax3* (C) en los progenitores dorsales en regiones más caudales. (D) Dibujo esquemático del embrión de ratón de 9,5 dpc en el que se señala la posición del tubo neural a la que corresponden las imágenes A-C. (E) En embriones de 10,5 dpc *Sox5* se expresa en las CCN y en los progenitores en la zona ventricular. (F,G) En regiones caudales *Sox5* sólo se expresa en la placa del suelo. (H) Dibujo esquemático del embrión de ratón de 10,5 dpc en el que se señala la posición del tubo neural a la que corresponden las imágenes E-G. (C,H) Modificadas de las imágenes disponibles en e-Mouse Atlas Project (www.emouseatlas.org).

de manera progresiva según se produce la elongación del embrión, las secciones más rostrales representan estadios de desarrollo más avanzados que las caudales.

En embriones de ratón de estadio 9,5 dpc (21-29 somitas), analizados mediante inmunohistoquímica, Sox5 se expresa en las CCN pre- y migratoria donde coincide con Ap2a y Pax7 (Fig. 11A-B), y en los progenitores más dorsales del tubo neural en los que se coexpresa con Pax3 y Pax7 (Fig. 11B-C). Al igual que ocurre en los embriones de pollo, también se detectó expresión de Sox5 en la placa del suelo. Más adelante, en estadio de 10,5 dpc (35-39 somitas), y mediante hibridación *in situ*, se observó expresión de Sox5 en las CCN y en los progenitores de la zona ventricular (Fig. 11E). Algunos progenitores ventrales, incluidos los de motoneuronas, no expresan Sox5 (Fig. 11C). A niveles caudales, donde la diferenciación neuronal no se ha iniciado, Sox5 no se expresa en los progenitores neurales, sólo en la placa del suelo (Fig. 11F-G).

1.3. Sox5 se expresa en la cresta neural y en los progenitores en embriones de pez medaka

En el estudio de los genes Sox en teleósteos se describió en primer lugar la existencia de dos copias de Sox11 en pez cebra (Rimini *et al.*, 1999). Las proteínas para las que codifican estos genes tienen 354 y 368 aa, difieren en una única posición en su caja HMG y son muy similares a las proteínas Sox11 humana y de pollo. Estudios posteriores en pez cebra han descrito también la existencia de dos copias de Sox9 (Sox9a y Sox9b). Además, estudios genómicos del pez fugu, han demostrado la existencia de dos copias para seis genes Sox diferentes (Sox1, Sox6, Sox8, Sox9, Sox10 y Sox4; Koopman *et al.*, 2004). Algunos de estos genes Sox duplicados se han descrito también en pez medaka en cuyo genoma se han identificado dos copias de Sox9 (Klüver *et al.*, 2005) y, posteriormente de Sox6, pero sólo se ha descrito una copia de Sox5 (Cui *et al.*, 2011).

La existencia de dos copias de estos genes se debe fundamentalmente a la duplicación genómica completa que se produjo en el linaje de los teleósteos hace unos 320 millones de años (Vandepoele *et al.*, 2004). En muchos de estos casos de duplicación los dos genes presentan patrones de expresión característicos, aunque parcialmente coincidentes, de tal forma que entre ambos realizan la misma función que la copia única de mamíferos.

El análisis de la expresión de Sox5 en embriones de pez medaka se realizó mediante hibridación *in situ* en embriones completos. Para ello, a partir de la secuencia del ARNm de Sox5 predicha, se diseñaron dos oligonucleótidos específicos para RT-PCR (Tabla 2). El ARNm total se obtuvo de embriones de pez medaka de estadios 24-26. A

partir de él se sintetizó el ADNc que se utilizó como molde de PCR para amplificar un fragmento de 1156 pb con parte de la secuencia de Sox5. A partir de este fragmento clonado se sintetizó la ribosonda utilizada para las hibridaciones *in situ*. Sin embargo, a pesar de haber probado varias parejas de oligonucleótidos diferentes, no pudo obtenerse el ADNc completo de Sox5 de pez medaka.

En primer lugar se analizó la expresión de Sox5 en embriones de pez medaka de un día de desarrollo (4-6 somitas). Este es un estadio similar al de HH10-11 de embriones de pollo, puesto que ya se distinguen las tres regiones del encéfalo. En día 1 únicamente

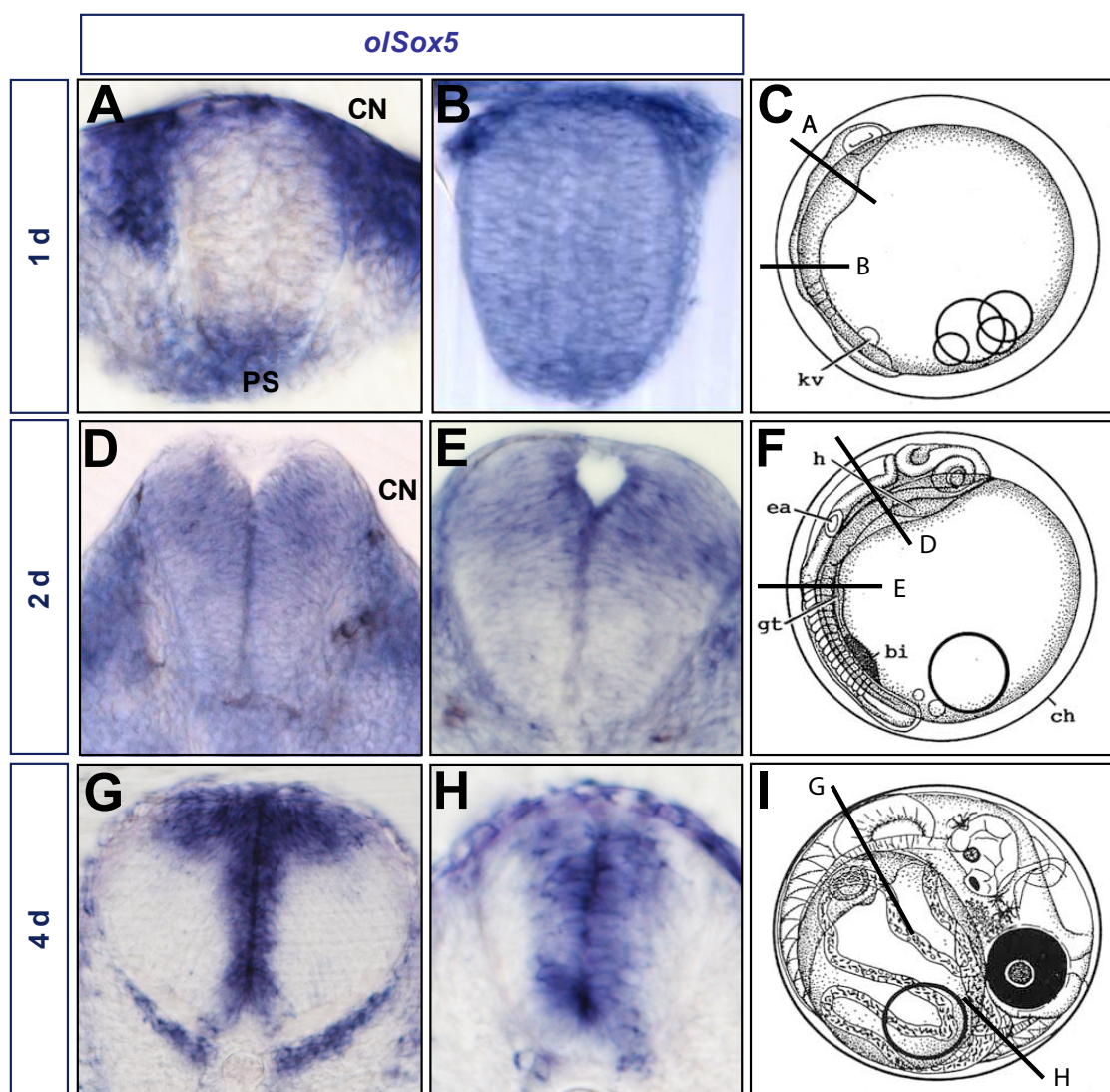


Fig. 12. Sox5 se expresa en la zona ventricular en embriones de pez medaka. Análisis mediante hibridación *in situ* de la expresión de Sox5. (A,B) En embriones de un día de desarrollo Sox5 se expresa en las CCN y en la placa del suelo. (C) Esquema de un embrión de medaka de 1 día en el que se representa el nivel de corte de las secciones A y B. (D,E) En embriones de 2 días Sox5 se expresa en las CCN y en los progenitores dorsales. (F) Esquema de un embrión de medaka de 2 días en el que se representa el nivel de corte de las secciones D y E. (G,H) En embriones de 4 días de desarrollo Sox5 se expresa en la zona ventricular en todos los progenitores, en la placa del techo y en la placa del suelo. (I) Esquema de un embrión de medaka de 4 días en el que se representa el nivel de corte de las secciones G y H. (C,F,I) Modificado de Iwamatsu 2004.

se detectó expresión de Sox5 en la placa del suelo y en las CCN migratoria en el tubo neural, aunque la expresión es muy intensa en los somitas adyacentes (Fig. 12A-B). Sin embargo, en los embriones de 2 días de desarrollo (12-16 somitas), en los cuales se aprecian claramente las vesículas ótica y óptica, se observó expresión de Sox5 en la mitad dorsal del tubo y no tan claramente en la placa del suelo (Fig. 12D-E). En estadios más avanzados de 4 días de desarrollo (30 somitas) la expresión de Sox5 se extendió a todos los progenitores a lo largo del eje D-V, la placa del suelo y la del techo (Fig. 12G-H). Esta expresión difiere de la de pollo en el estadio más avanzado que hemos analizado (HH25) en cuanto a que en pollo no detectamos expresión de Sox5 en los progenitores más dorsales.

En conjunto, en los tres organismos estudiados se observó expresión de Sox5 en las CCN y en la placa del suelo en embriones tempranos, mientras que en estadios avanzados la expresión de Sox5 se extiende a los progenitores. Esta expresión es más intensa en los progenitores dorsales que en los ventrales, aunque la caracterización fina de la expresión sólo se ha hecho en embriones de pollo. Además, la expresión de Sox5 también se observó en una subpoblación de motoneuronas, tanto en embriones de pollo como en los de ratón (Stolt *et al.*, 2006), y en las interneuronas dl3 que expresan Islet1/2 en los embriones de pollo (Martinez-Morales *et al.*, 2010).

2. Expresión de Sox6 en el tubo neural en embriones de pollo y ratón

Puesto que existe una gran homología a nivel de aa entre las proteínas Sox5 y Sox6 y, además, comparten patrones de expresión en condrocitos y en oligodendrocitos, decidimos analizar el patrón de expresión de Sox6 en el tubo neural de embriones de pollo y ratón. Al igual que ocurre con la expresión de Sox5, en estadios tempranos de embriones de pollo (HH11) el ARNm de Sox6 se detectó, mediante hibridación *in situ* en las CCN, en las regiones más dorsales del tubo neural, en la placa del suelo y en la notocorda a lo largo de todo el embrión (Fig. 13A-B). En embriones de estadio HH20 se observó expresión de Sox6 en la zona ventricular del tubo neural. Se observa una expresión más intensa de Sox6 en los progenitores dorsales-intermedios y más débil en progenitores muy dorsales y en los progenitores ventrales (Fig. 13C-D). Esta expresión de Sox6 es similar a la de Sox5, pero no ha sido caracterizada con el mismo detalle debido a la falta de disponibilidad de anticuerpos contra Sox6 y a que la ribosonda para Sox6 funciona más débilmente que la de Sox5.

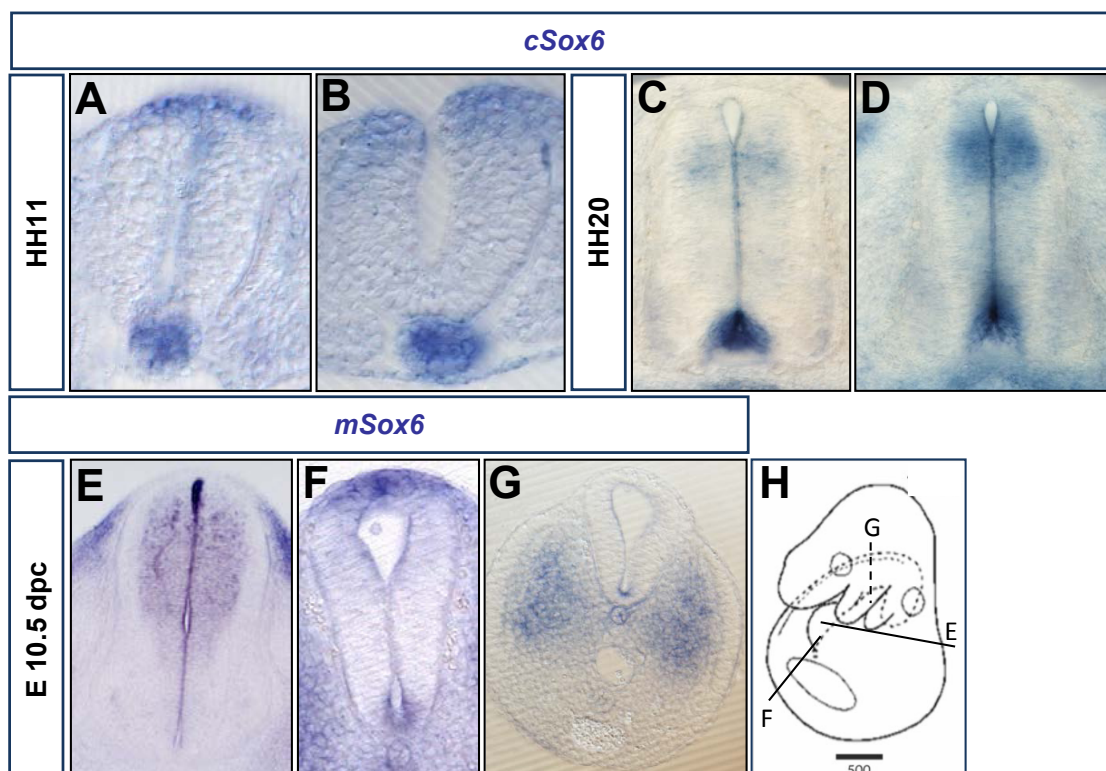


Fig. 13. Sox6 se expresa en los progenitores dorsales en embriones de pollo y ratón. Análisis de la expresión de *Sox6* mediante hibridación *in situ* en embriones de pollo (A-D) y ratón (E-G). (A,B) En embriones de pollo de HH11 *Sox6* se expresa en las CCN, en los progenitores más dorsales y en la placa del suelo. (C,D) En embriones de estadio HH20 *Sox6* se expresa en algunas subpoblaciones de progenitores dorsales del tubo neural y en la placa del suelo. (E,F) En embriones de ratón de 9,5 dpc *Sox6* se expresa en las CCN, en progenitores dorsales e intermedios (E) y en la placa del suelo. (G) En las regiones más caudales no se detecta expresión de *Sox6* en el tubo neural. (H) Dibujo esquemático del embrión de ratón de 9,5 dpc en el que se señala la posición del tubo neural a la que corresponden las imágenes E-G. Modificado de las imágenes disponibles en e-Mouse Atlas Project (www.emouseatlas.org).

Por otra parte, en embriones de ratón pudimos observar, en las secciones más rostrales del tubo neural, expresión de *Sox6* en todos los progenitores, aunque sólo de forma muy débil en los más ventrales (Fig. 13E). En las regiones caudales y, por tanto, en etapas más tempranas de desarrollo, la expresión de *Sox6* queda restringida a la zona más dorsal del tubo neural (Fig. 13F) y a la placa del suelo, mientras que en zonas más caudales no fue posible detectar expresión de *Sox6* en el tubo neural (Fig. 13G).

Estos análisis nos permiten concluir que en el tubo neural la expresión de *Sox5* y *Sox6* es parcialmente coincidente en los progenitores dorsales, en la placa del suelo y, tal vez, en motoneuronas, a lo largo del desarrollo tanto en embriones de pollo como en ratón (Fig. 10,11,13; Stolt *et al.*, 2006). Además, se ha observado que el patrón de expresión de *Sox5* en el tubo neural se ha conservado a lo largo de la evolución puesto que es muy similar en los embriones de pollo, ratón y pez medaka. La expresión de *Sox6* se encuentra conservada entre pollo y ratón en los progenitores de la médula espinal y, especialmente, en las poblaciones dorsales. Para *Sox6* se ha descrito la existencia de dos

copias, Sox6a y Sox6b (Cui *et al.*, 2011) en embriones de medaka, por lo que en el futuro habría que analizar la expresión de ambos genes para determinar si hay conservación con la expresión de Sox6 de pollo y ratón.

3. La expresión ectópica de Sox5 altera la identidad de los progenitores dorsales

Con el objetivo de determinar si Sox5 participa en la regionalización del tubo neural se realizaron experimentos funcionales en diferentes organismos modelo. Se llevaron a cabo experimentos de sobre-expresión de Sox5 en tubo neural de embriones de pollo mediante electroporación *in ovo* (que permite expresar de forma ectópica proteínas en un hemitubo, dejando el otro lado como control contralateral) y experimentos de inyección de ARNm en embriones de medaka en estadio de 2 células. Los estudios en medaka se abordarán en la sección 7. Para los experimentos de expresión ectópica de Sox5 mediante electroporación en embriones de pollo se utilizó la construcción Sox5-IRES-EGFP-pCAGGS (Sox5-pCIG). Se trata de una construcción bicistrónica que expresa tanto Sox5 como el reportero EGFP que permite identificar la región del tubo neural electroporada. Como control se utilizó el mismo vector, sólo con EGFP, EGFP-pCAGGS (pCIG). La electroporación se realizó al nivel troncal de los últimos somitas de embriones de pollo de estadio HH11-12 (13-16 somitas) que fueron analizados 30 horas post-electroporación (PE), aproximadamente en estadio HH17-18 (30-36 somitas).

El análisis de los embriones se realizó mediante inmunohistoquímica con anticuerpos que reconocen los factores de transcripción que se expresan diferencialmente en los progenitores de los distintos dominios a lo largo del eje D-V (Fig. 9). La expresión ectópica de Sox5 produce la expansión de la expresión de Pax7 hacia regiones más ventrales (Fig. 14D), mientras que la expresión de Msx1/2 se restringe a una región más dorsal (Fig. 14E) en comparación con el lado contralateral del tubo neural no electroporado y con los embriones electroporados con la construcción control pCIG (Fig. 14A-B'). En estos análisis el anticuerpo utilizado reconoce tanto la proteína Msx1 como Msx2. Sin embargo, mediante hibridación *in situ* con sondas específicas para cada uno de los dos genes, sólo se detectó reducción en la expresión de Msx1 con respecto a los controles electroporados con pCIG (datos no mostrados). Lmx1, marcador de la placa del techo donde se coexpresa con Sox5, mostró una expansión ventral en embriones con expresión ectópica de Sox5 (Fig. 14F), en comparación con los embriones control (Fig. 14C).

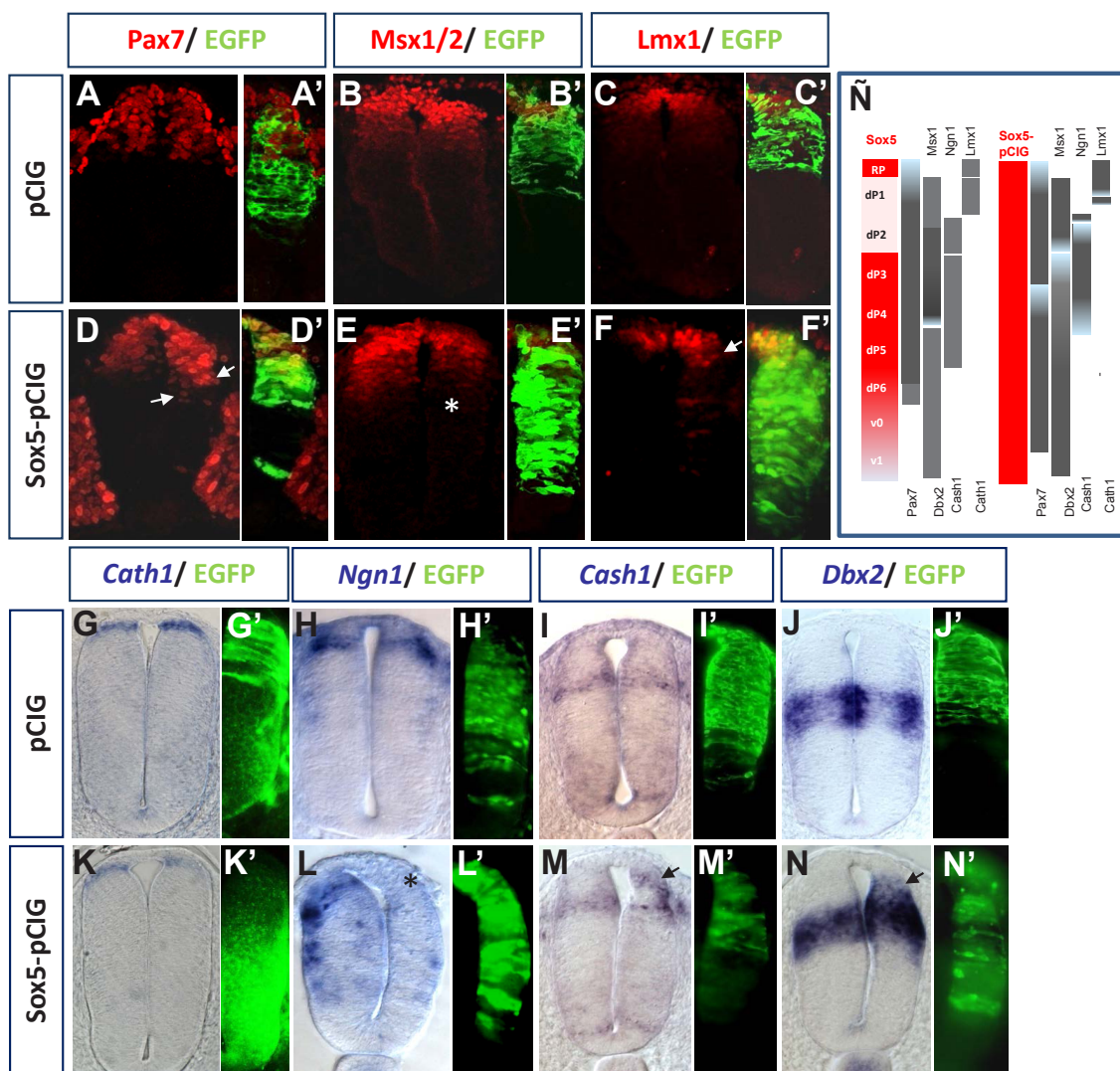


Fig. 14. La expresión ectópica de Sox5 altera la identidad de los progenitores dorsales. Los embriones de pollo de estadio HH11 se electroporaron con pCIG (A-C', G-J') o Sox5-pCIG (D-F', K-N') y fueron analizados 30 horas PE en estadio HH17-18 mediante inmunohistoquímica (A-F') o hibridación *in situ* (G-N'). (D,D') La expresión de Pax7 se extiende ventralmente en embriones con niveles elevados de Sox5 (flecha) en relación con el embrión control electroporado con pCIG (A,A'). (E,E') La expresión ectópica de Sox5 provoca una disminución de la expresión de Msx1/2 (asterisco) y extiende la de Lmx1 más allá de la placa del techo (F,F') en comparación con los controles (B-C'). La expresión de *Cath1* disminuye ligeramente (K,K') mientras que la reducción de la expresión de *Ngn1* (asterisco negro) es muy pronunciada (L,L') en embriones con exceso de función de Sox5 con respecto a los electroporados con pCIG (G-H'). Por el contrario, la expresión de *Cash1* (flecha; M,M') y *Dbx2* (flecha; N,N') se expande dorsalmente en los embriones con sobre-expresión de Sox5 en relación con los controles (I-J'). (N') Esquema que representa la alteración de la identidad de los progenitores dorsales en embriones electroporados con Sox5-pCIG.

Pax7 y Msx1 se expresan en regiones amplias del tubo neural dorsal que comprenden varios dominios diferentes de progenitores (Mansouri & Gruss, 1998; Pierani *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1996), con bordes poco definidos en estadios tempranos del desarrollo. El análisis de marcadores con dominios de expresión más restringidos, mediante hibridación *in situ*, demostró que la expresión desregulada de Sox5 provoca

una drástica reducción de la expresión de *Cath1* en el dominio de progenitores dp1 (Fig. 14K) y de la de *Ngn1* del dominio dp2 (Fig. 14L; Lo *et al.*, 1991; Ma *et al.*, 1997) en relación con los embriones control electroporados con pCIG (Fig. 14G-H).

Las proteínas bHLH, como *Cath1*, *Ngn1* y *Cash1*, por un lado y los factores de transcripción de tipo homeodominio (HD), como *Msx1* y *Dbx2*, por otro lado, se expresan en dominios adyacentes en el tubo neural. Entre proteínas del mismo grupo (bHLH o bien HD) se producen relaciones de inhibición cruzada que permiten el correcto establecimiento de los límites de los diferentes dominios de progenitores y los refuerzan (Timmer *et al.*, 2002). Así, no es de extrañar, que la disminución en el dominio de expresión de *Ngn1* y *Msx1* provocada por la expresión ectópica de *Sox5*, se vea acompañada de una expansión en la expresión de *Cash1* (dp3-dp5, Fig. 14M; Ma *et al.*, 1997) y de *Dbx2* (dp5-v1, Fig. 14N), respectivamente, hacia dominios más dorsales con respecto a los embriones control (Fig. 14H-I').

En conjunto, la expresión ectópica de *Sox5* produjo una disminución de los dominios de progenitores dorsales dp1 y dp2 a costa de la expansión de los de los dominios adyacentes, es decir, de la placa del techo y el dominio dp3.

4. Sox5 es necesario para la correcta especificación de los progenitores dorsales

De forma complementaria, se realizaron experimentos de falta de función con el fin de determinar si *Sox5* es necesario para la especificación de los progenitores dorsales. Para ello se electroporó en embriones de pollo un “short hairpin” (shARN), que funciona como ARN interferente, en una construcción que lleva como reportero DsRed (*Sox5*-pRFPRNAi) en embriones de HH11 que fueron analizados 30 horas después de la electroporación. Se utilizaron cuatro shARN diferentes y se comprobó que al menos dos de ellos (ARNi1 y ARNi2) reducían los niveles de *Sox5* en un $66 \pm 4\%$ (con ARNi1), 48 horas PE en estadio HH19-20 (Martínez-Morales *et al.*, 2010). Como control se utilizó el mismo vector con un shARN específico de la secuencia del gen de la luciferasa (*Luc*-RFPRNAi) que, por lo tanto, no afecta a la expresión de ningún gen del embrión de pollo. Al contrario de lo que se observó en los experimentos de exceso de función, cuando disminuyen los niveles endógenos de *Sox5* se produce una reducción de la expresión de *Pax7*, que queda restringida a un dominio de expresión más dorsal (Fig. 15D), mientras que el límite de expresión de *Msx1/2* se extiende hasta zonas más ventrales (Fig. 15E), en comparación con los embriones control (Fig. 15A-B'). Además, la expresión de *Lmx1*

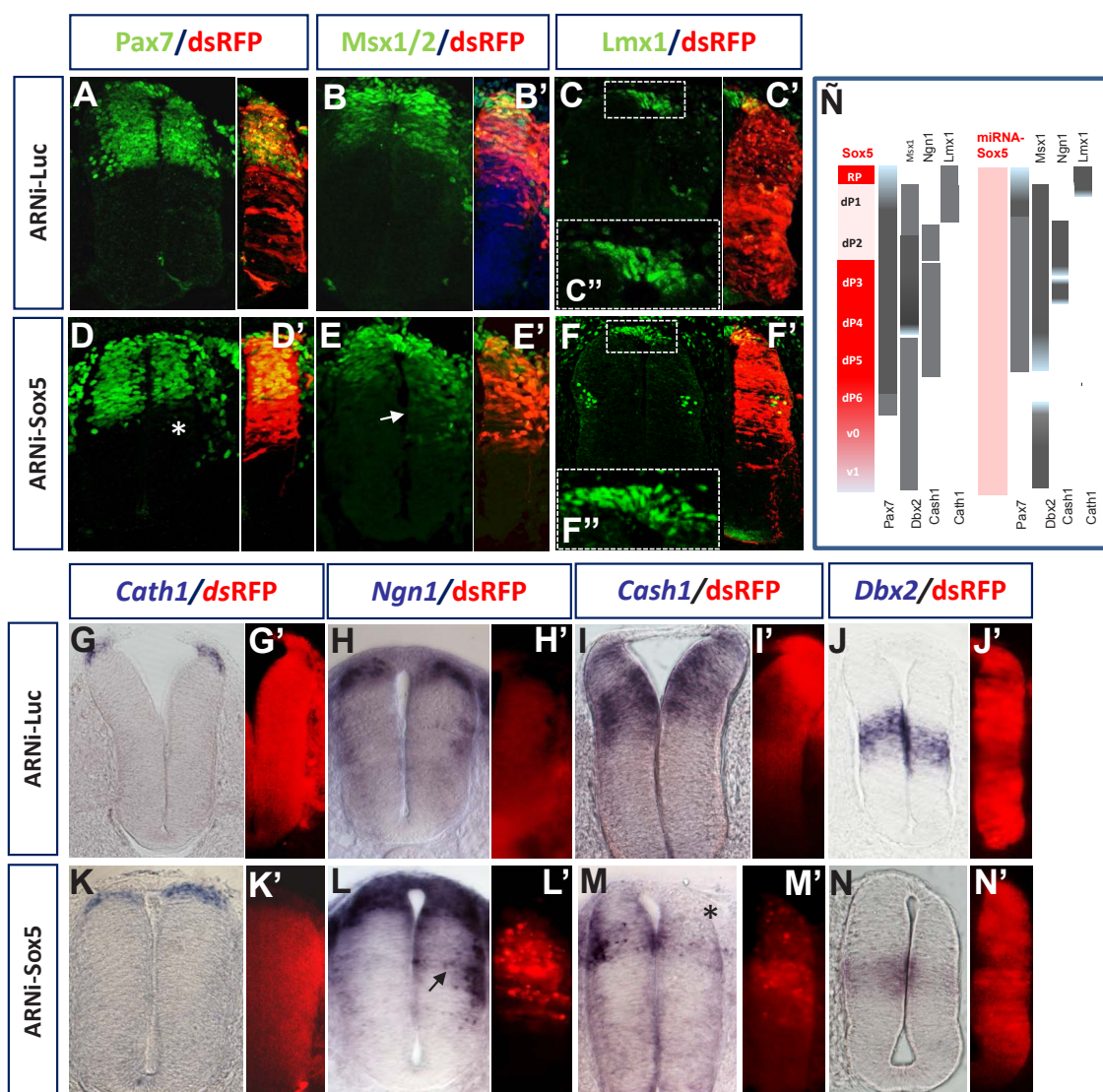


Fig. 15. Sox5 es necesario para la especificación correcta de los progenitores dorsales. Los embriones de pollo de estadio HH11 se electroporaron con Luc-RFPRNAi (ARNi-Luc; A-C'', G-J') o Sox5-RFPRNAi (ARNi-Sox5; D-F'', K-N') y fueron analizados 30 horas PE en estadio HH17-18 mediante inmunohistoquímica (A-F'') o hibridación *in situ* (G-N'). La expresión de Pax7 (D,D'; asterisco) y Lmx1 (F-F'') está reducida en relación con la de los embriones control electroporados con Luc-RFPRNAi (A,A'; C-C''). La falta de función de Sox5 provoca una disminución de la expresión de Msx1/2 (E,E'; flecha) en relación con los embriones control (B-B'). En embriones con bajos niveles de Sox5 se produce un ligero aumento de la expresión de *Cath1* (K,K') y más pronunciado de *Ngn1* (L,L') en relación con los embriones electroporados con Luc-RFPRNAi (G-H'). Por otro lado, la expresión de *Cash1* y *Dbx2* está reducida en los embriones electroporados con Sox5-RFPRNAi (M-N') con respecto a los embriones control (I-J'). (Ñ) Esquema que representa la alteración de la identidad de los progenitores dorsales en embriones electroporados con Sox5-RFPRNAi.

disminuye en la placa del techo en los embriones con niveles reducidos de Sox5 (Fig. 15F), en relación con los electroporados con el control Luc-RFPRNAi (Fig. 15C).

Asimismo, en los embriones con expresión reducida de Sox5, el patrón de expresión de los genes proneurales también se encuentra alterado. Así, se observó un incremento en la expresión de *Cath1* (dp1) y *Ngn1* (dp2) hacia territorios más ventrales

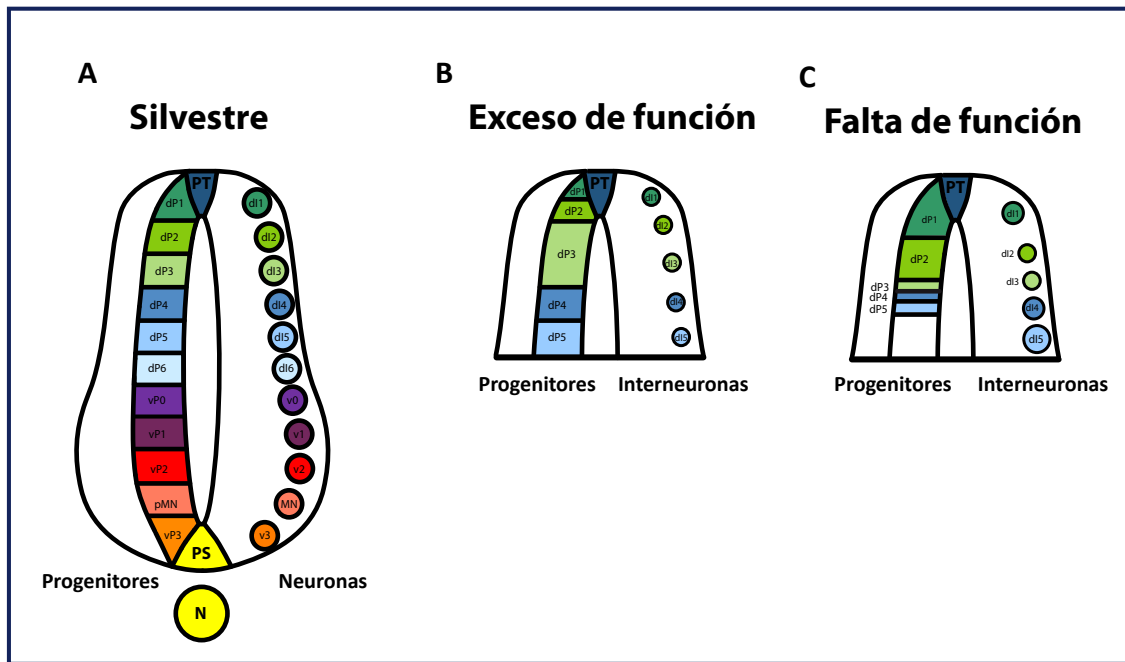


Fig. 16. Alteraciones en las poblaciones de progenitores e interneuronas en embriones con exceso y falta de función de Sox5. Representación esquemática del tubo neural de embriones de pollo sin electroporar (A), electroporado con Sox5-pCIG (B) y Sox5-RFPRNAi. Los datos de las poblaciones de interneuronas en embriones que expresan Sox5 de forma ectópica proceden de Martínez-Morales *et al.*, 2010.

(Fig. 15K-L') con respecto a los controles (Fig. 15G-H'). Por el contrario, en los embriones electroporados con Sox5-RFPRNAi se detectó una fuerte reducción de la expresión de *Cash1* (dp3-dp5), especialmente en el territorio más dorsal (Fig. 15M), y una drástica disminución de la de *Dbx2* (Fig. 15N; dp5-v1), en comparación con los embriones control (Fig. 15I-J').

En conjunto, la reducción de los niveles de Sox5 produjo una alteración de la identidad dorsal opuesta a la obtenida en los experimentos de sobre-expresión de Sox5, ya que se observó una expansión de los marcadores de los progenitores más dorsales a costa de una reducción de los intermedios (Fig. 16). Es decir, Sox5 es necesario para el mantenimiento o especificación de la placa del techo y para la correcta especificación de los progenitores dorsales dp3-dp5. Además, la expresión ectópica de Sox5 interfiere con la adquisición de la identidad de los progenitores más dorsales dp1 y dp2.

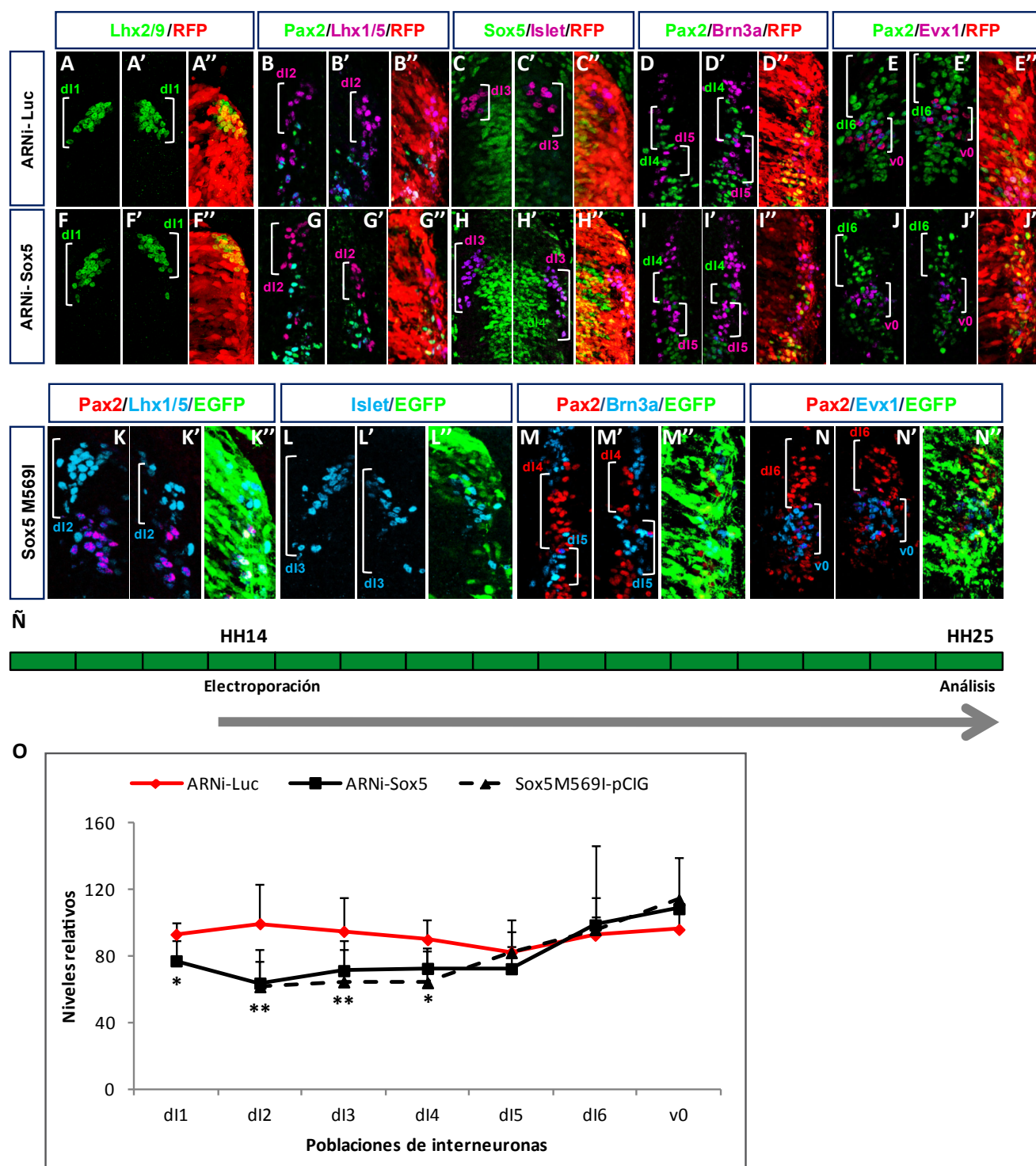


Fig. 17. La expresión de Sox5 es necesaria para la especificación de las interneuronas dorsales. Los embriones de pollo se electroporaron en estadio de HH14 con Luc-RFPRNAi (A-E''), Sox5-RFPRNAi (F-J'') o Sox5^{M569I}-pCIG (K-N'') y se analizaron 48 horas PE en estadio HH24-25 mediante inmunohistoquímica. La reducción de los niveles de Sox5 provoca una disminución de las poblaciones de interneuronas dorsales dl1 (Lhx2/9⁺; F-F''), dl2 (Lhx1/5⁺/Pax2⁻; G-G''), dl3 (Islet 1/2⁺; H-H'') y dl4 (Pax2⁺/Brn3a⁻; I-I'') en relación con los embriones control electroporados con Luc-RFPRNAi (A-D''). No se produjeron cambios significativos en las poblaciones dl5 (Brn3a⁺/Pax2⁻; I-I''), dl6 (Pax2⁺/Evx1⁻; J-J'') y v0 (Evx1⁺/Pax2⁻; J-J'') con respecto a sus controles (D-E''). En los embriones electroporados con Sox5^{M569I}-pCIG también se observó una disminución de las poblaciones de interneuronas dorsales dl2 (K-K''), dl3 (L-L'') y dl4 (M-M'') mientras que no se producen variaciones en las poblaciones dl5 (M-M'') y dl6 (N-N'') pero sí un ligero aumento en las interneuronas ventrales v0 (N-N''). (Ñ) Esquema temporal de la electroporación y el análisis de los embriones. (O) Análisis cuantitativo del número de interneuronas de las distintas poblaciones representadas como la media \pm desviación típica del número de células del hemitubo electroporado que expresan cada marcador con respecto a las que expresan el mismo marcador en el hemitubo no electroporado (% células⁺ EP/células⁺ control). *p<0,05; **p<0,01.

5. Sox5 participa en la diferenciación de las interneuronas dorsales

Estudios en embriones de ratón han demostrado que los cambios de identidad de los progenitores dorsales, producidos por alteración de la vía de Wnt, tienen una consecuencia directa en la identidad de las poblaciones de interneuronas a las que estos dan lugar (Muroyama *et al.*, 2002).

En los progenitores de los embriones con niveles de Sox5 reducidos (electroporados con Sox5-PRFPRNAi) se ha observado una expansión, hacia zonas más ventrales, de la expresión de *Cath1*, *Ngn1* y *Msx1* (Fig. 15). Con el fin de determinar si esta alteración provoca un cambio en la especificación de las interneuronas dorsales derivadas de esos dominios, se realizaron experimentos de falta de función de Sox5 (utilizando la construcción Sox5-RFPRNAi) en embriones de HH14. Estos embriones fueron analizados 48 horas después de la electroporación en estadio de HH25 aproximadamente, una vez que se ha iniciado la diferenciación de la mayor parte de los subtipos de interneuronas dorsales e intermedias. Los distintos subtipos de interneuronas se identificaron mediante inmunohistoquímica utilizando una combinación específica de anticuerpos para cada población: las dI1 son Lhx2/9⁺; las dI2 son Lhx1/5⁺/Pax2⁻; las dI3, Islet1/2⁺; las dI4, Pax2⁺/Brn3a⁻; las dI5, Brn3a⁺/Pax2⁻; las dI6, Pax2⁺/Evx1⁻, y las v0, Pax2⁺/Evx1⁺ (Fig. 9). En los embriones con niveles reducidos de Sox5 se observó una disminución del 36±13% y del 25±19% del número de interneuronas de las poblaciones dI2 y dI3, respectivamente, y una reducción ligera del 17±13% y del 19±12% en las poblaciones dI1 y dI4, respectivamente (Fig. 17F-H; Ñ), con respecto al lado control no electroporado y a los embriones control electroporados con Luc-RFPRNAi (Fig. 17A-C, Ñ). Sin embargo, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en el número de interneuronas intermedias dI5-dI6 (Fig. 17H-I) con respecto a los controles (Fig. 17C-D). A pesar de que el número de interneuronas ventrales v0-v1 es mayor en los embriones con niveles reducidos de Sox5 (Fig. 17I-J, Ñ) respecto a los embriones control (Fig. 17D-E, Ñ), la diferencia no resulta estadísticamente significativa.

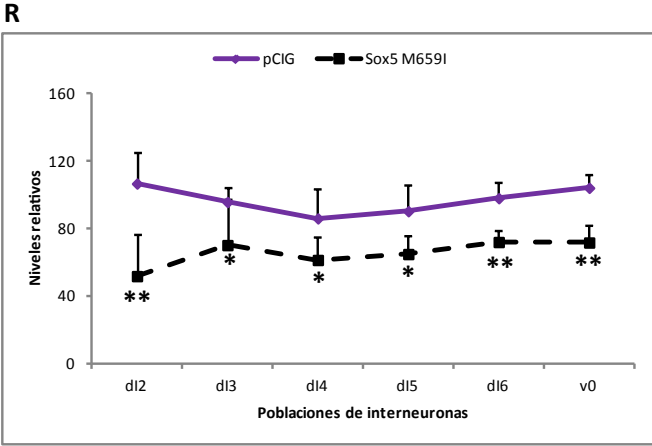
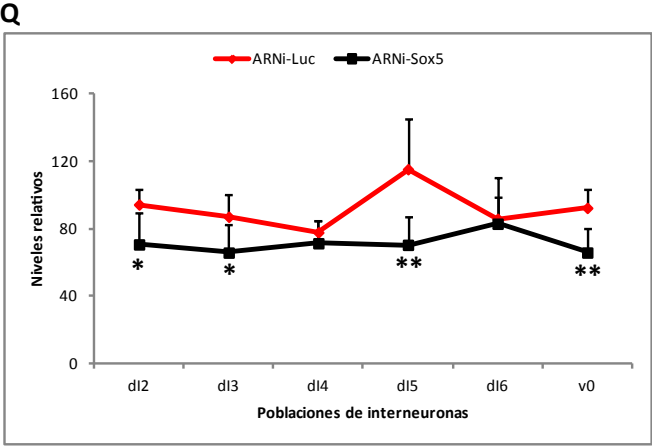
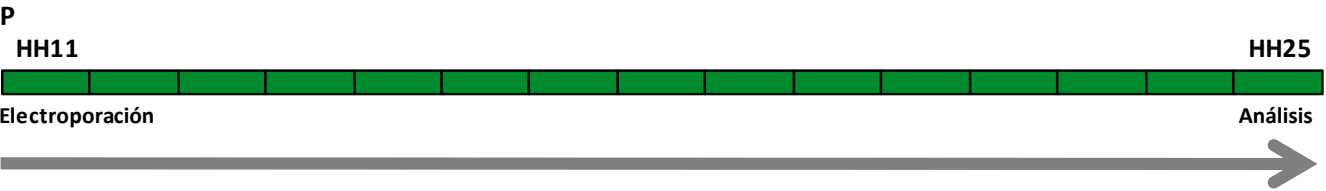
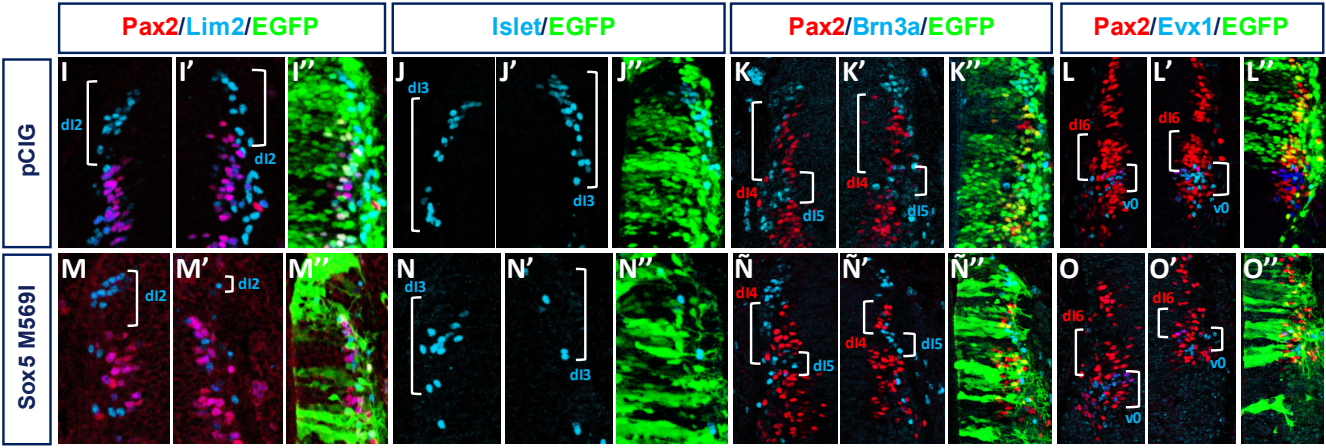
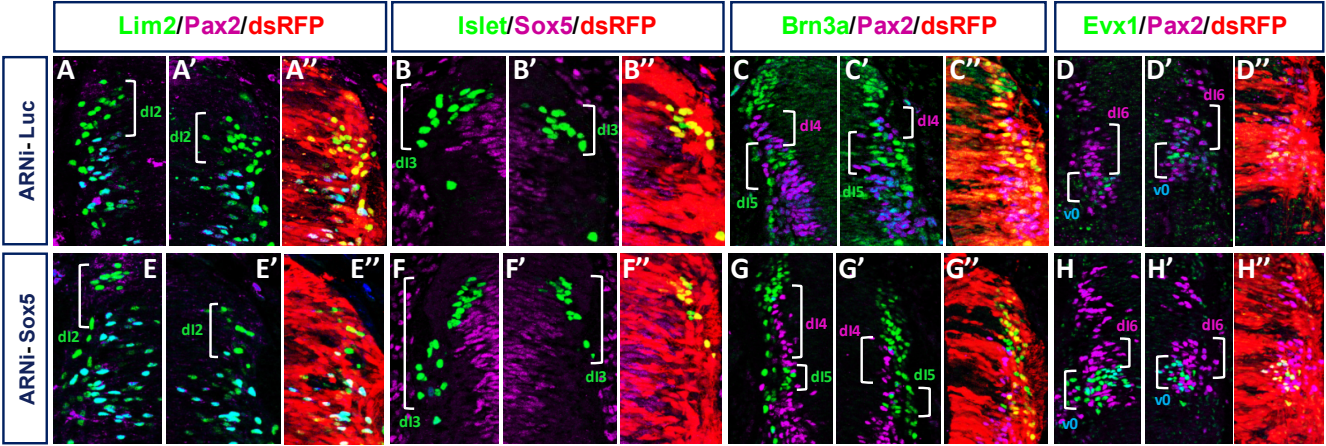
Se ha demostrado que una mutación puntual en el residuo M64I del HMG de Sry produce un cambio de 13 grados en el ángulo de torsión del ADN y una considerable reducción de la actividad biológica de la proteína, que provoca un síndrome de reversión sexual en humanos (Murphy *et al.*, 2001). Con la intención de conseguir una proteína Sox5 con actividad transcripcional disminuida y, sobre todo, con posible actividad dominante negativa sobre la proteína Sox5 endógena, diseñamos una proteína con una mutación equivalente en el HMG de Sox5 (Sox5^{M569I}) y que conservaría intactos los dominios de interacción con otras proteínas.

Utilizando la proteína mutada Sox5^{M569I}, que presenta una escasa capacidad de unión al ADN (Fig. 22B) y baja actividad transcripcional (Fig. 22C) según describiremos más adelante, en electroporaciones en embriones de HH14 analizados 48 hr PE por inmunohistoquímica, se observó de nuevo una disminución estadísticamente significativa del número de interneuronas dl2, dl3 y dl4 de un 38±19%, 34±24% y 28±22%, respectivamente; mientras que las dl5 se mantuvieron iguales en número (Fig. 17K-M, Ñ) y se detectó un ligero incremento, aunque no significativo, en el número de dl6 (Fig. 17D, Ñ). La población dl1 no se analizó en estos experimentos. Estos resultados, idénticos a los obtenidos tras reducción de los niveles endógenos de Sox5, sugieren que la proteína Sox5^{M569I} podría tener una actividad dominante negativa, probablemente formando homodímeros con proteínas de Sox5 endógenas, e impidiendo que éstas se unan correctamente al ADN y modulen la transcripción.

En resumen, estos análisis indican Sox5 es necesario para la generación del número apropiado de las interneuronas dorsales dl2-dl4, en parte mediante el control de la especificación de los progenitores dorsales de los que proceden.

Con el objetivo de determinar si la reducción del número de las interneuronas más dorsales era consecuencia de la ventana temporal en la cual se estaba bloqueando la expresión de Sox5 (electroporación en HH14 cuando ya se ha establecido la especificación de los dominios de progenitores) se realizó un nuevo experimento de falta de función electroporando más tempranamente, en estadio de HH11, y analizando las interneuronas mediante inmunohistoquímica tras 72 horas de incubación, aproximadamente en estadio de HH24-5.

En los embriones electroporados con Sox5-RFPRNAi se observó una disminución estadísticamente significativa en el número de interneuronas de las poblaciones dorsales dl2-dl3 y dl5 y de las interneuronas ventrales v0 de 25±20% (dl2), 24±19% (dl3), 40±14% (dl5) y 29±16% (v0), respectivamente (Fig. 18E-H) con respecto a los embriones control electroporados con Luc-RFPRNAi (Fig. 18A-D,P). De manera más extensa, en embriones electroporados con la forma mutante Sox5^{M569I}-pCIG se detectó una disminución estadísticamente significativa del número de todas las neuronas analizadas, las interneuronas dorsales dl2-dl6 y las ventrales v0, de 51±23% (dl2), 27±28% (dl3), 29±16% (dl4), 28±12% (dl5), 26±7% (dl6) y 31±10% (v0) (Fig. 18M-O) con respecto a los embriones electroporados con pCIG (Fig. 18I-L,P). En los experimentos de bloqueo de función en HH14, Sox5-RFPRNAi y Sox5^{M569I}-pCIG presentan un comportamiento muy similar con la reducción del número de interneuronas dl2-dl4. Sin embargo, cuando se electroporan en la ventana temprana (HH11) Sox5^{M569I}-pCIG provoca una disminución del número de interneuronas de todas las poblaciones analizadas (dl2-dl6) mientras que con Sox5-RFPRNAi sólo disminuyen las dl2-dl3 y dl5. Esto puede ser debido a que



Sox5^{M569I} esté secuestrando a Sox6 o Sox13 e impidiendo su actividad. En esta etapa temprana Sox6 y Sox13 pueden estar controlando la salida de ciclo de los progenitores, y por ello el número final de las interneuronas se ve afectado. En ninguno de los dos experimentos de falta de función de Sox5 se observó un incremento de interneuronas que compensara esta la disminución de las interneuronas dorsales, aunque no se han analizado poblaciones más ventrales que v0. En conclusión, la falta temprana de Sox5, iniciada en etapas netamente proliferativas, afecta no sólo a las poblaciones más dorsales (dl2-dl4), como ocurría en los experimentos en la ventana tardía (Fig. 17), sino también a las intermedias (dl5-v0).

Esta disminución casi generalizada (especialmente con la expresión de la forma mutada Sox5^{M569I}) en el número de interneuronas durante la ventana temporal temprana (HH11-HH24) podría ser consecuencia de un incremento de la apoptosis debida a los defectos en salida del ciclo de los progenitores, descritos previamente en la falta temprana de Sox5 (ventana temporal de HH11-HH19; Martínez-Morales *et al.*, 2010). Para determinar si este era el caso, se coelectroporó el factor de supervivencia Bcl2 en el vector pCDNA3 (Cayuso *et al.*, 2006; Martínez-Morales *et al.*, 2010), que impide la muerte celular por apoptosis, junto con Sox5-pRFPRNAi en embriones en estadio de HH11 y se analizaron 72 horas PE en estadio HH24-25. En embriones con niveles reducidos de Sox5 y sobreexpresión de Bcl2, el número de interneuronas de las poblaciones dl2 y dl4-v0 se mantuvo similar (Fig. 19E,G-H) al de los embriones control (Fig. 19A,C-D,I). Sorprendentemente, se detectó un ligero aumento del 16±17% del número de interneuronas dl3 en los embriones con falta de función de Sox5 y Bcl2 (Fig. 19F) con respecto a los embriones control (Fig. 19B,I). Por tanto, la reducción en el número de interneuronas en la ventana temporal temprana, netamente proliferativa, se debió a

Fig. 18. La expresión de Sox5 en etapas tempranas de desarrollo es necesaria para que se especifiquen las interneuronas dorsales. Los embriones de pollo se electroporaron en estadio de HH11 con Luc-RFPRNAi (A-D''), Sox5-RFPRNAi (E-H''), pCIG (I-L'') o Sox5^{M569I}-pCIG (M-O'') y se analizaron 72 horas PE en estadio HH24-25 mediante inmunohistoquímica. La reducción de los niveles de Sox5 mediante electroporación de Sox5-RFPRNAi provoca una disminución de las poblaciones de interneuronas dorsales dl2 (Lhx1/5⁺/Pax2⁻; E-E''), dl3 (Islet 1/2⁺; F-F''), dl5 (Brn3a⁺/Pax2⁻; G-G'') y v0 (Evx1⁺/Pax2⁻; H-H'') en relación con los embriones control electroporados con Luc-RFPRNAi (A-D''). Las poblaciones dl4 (Pax2⁺/Brn3a⁻; G-G'') y dl6 (Pax2⁺/Evx1⁻; H-H'') no varían con respecto a los embriones control (C-D''). En los embriones electroporados con Sox5^{M569I}-pCIG se detectó una disminución de todas las poblaciones de interneuronas analizadas dl2 (Lhx1/5⁺/Pax2⁻; M-M''), dl3 (Islet 1/2⁺; N-N''), dl4 (Pax2⁺/Brn3a⁻; Ñ-Ñ''), dl5 (Brn3a⁺/Pax2⁻; Ñ-Ñ''), dl6 (Pax2⁺/Evx1⁻; O-O'') y v0 (Evx1⁺/Pax2⁻; O-O'') con respecto a los controles electroporados con pCIG (I-L''). (P) Esquema temporal de la electroporación y el análisis de los embriones. (Q) Análisis cuantitativo del número de interneuronas de las distintas poblaciones en embriones electroporados con Luc/Sox5-RFPRNAi representadas como la media ± desviación típica del número de células del hemitubo electroporado que expresan cada marcador con respecto a las que expresan el mismo marcador en el hemitubo no electroporado (% células + EP/células+ control). (R) Análisis cuantitativo del número de interneuronas de las distintas poblaciones en embriones electroporados con Sox5^{M569I}-pCIG/pCIG. *p<0,05; **p<0,01.

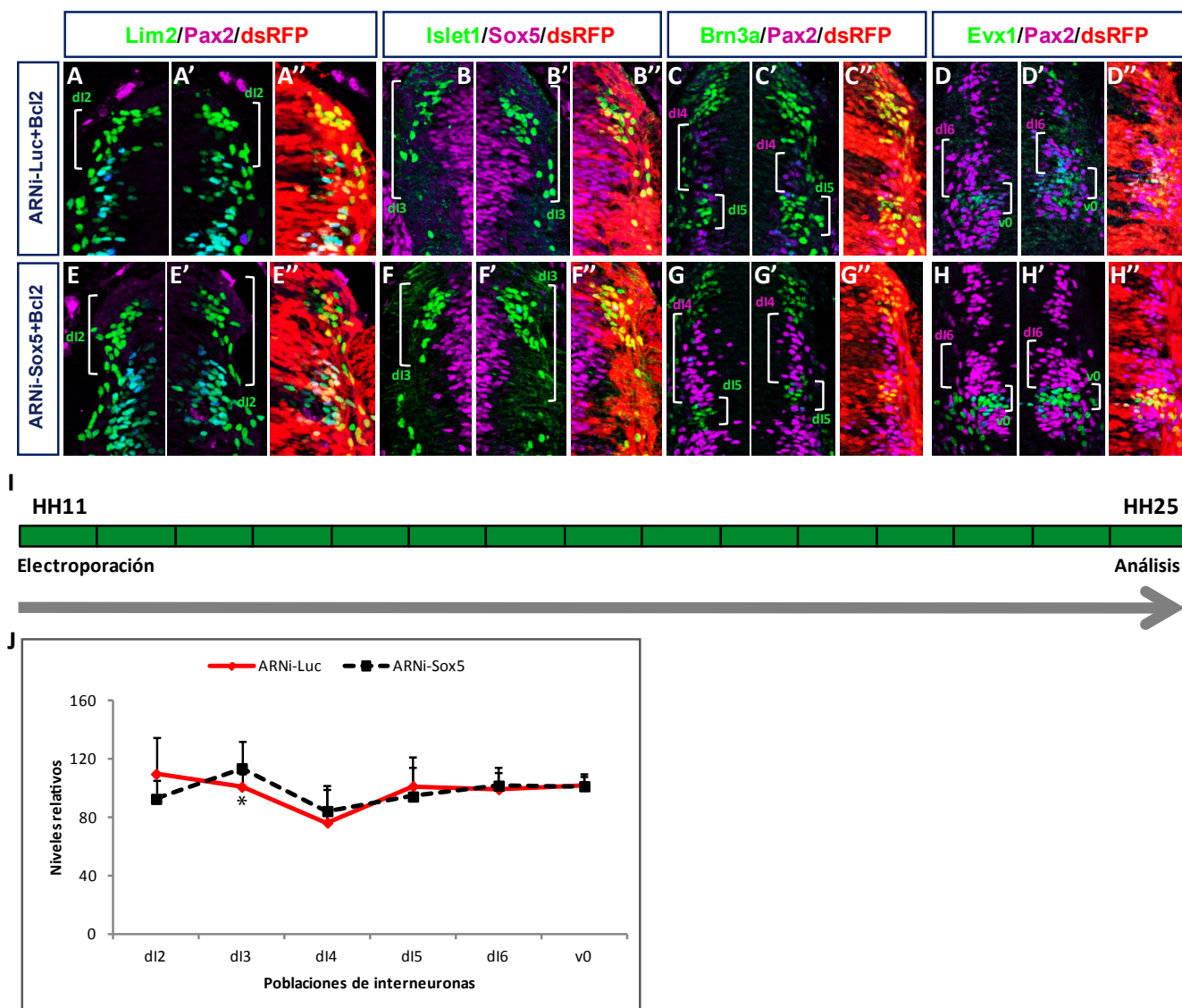


Fig. 19. La reducción de Sox5 en etapas tempranas provoca la muerte de las interneuronas. Los embriones de pollo se electroporaron en estadio de HH11 con Luc-RFPRNAi + Bcl2-pCDNA3 (A-D'') o Sox5-RFPRNAi + Bcl2-pCDNA3 (E-H'') y se analizaron 72 horas PE en estadio HH24-25 mediante inmunohistoquímica. En los embriones con niveles reducidos de Sox5 se observa un número de interneuronas de las poblaciones dl2 (Lhx1/5⁺/Pax2⁻; E-E''), dl4 (Pax2⁺/Brn3a⁻; G-G''), dl5 (Brn3a⁺/Pax2⁻; G-G''), dl6 (Pax2⁺/Evx1⁻; H-H'') y v0 (Evx1⁺/Pax2⁻; H-H'') similar a los observados en los embriones control electroporados con Luc-RFPRNAi (A-A'', C-D''). El número de interneuronas de la población dl3 (Islet 1/2⁺; F-F'') se encuentra incrementado en relación con su control (B-B''). (I) Esquema temporal de la electroporación y el análisis de los embriones. (J) Análisis cuantitativo del número de interneuronas de las distintas poblaciones en embriones electroporados con Luc/Sox5-RFPRNAi representadas como la media \pm desviación típica del número de células del hemitubo electroporado que expresan cada marcador con respecto a las que expresan el mismo marcador en el hemitubo no electroporado (% células + EP/células + control). * $p < 0,05$.

una pérdida de la supervivencia de todas las poblaciones de interneuronas dorsales. Esta apoptosis pudiera estar asociada al fallo en la salida de ciclo de los progenitores con niveles reducidos de Sox5 y, además, en el caso de la población dl3, al requerimiento especial de Sox5 en la supervivencia de las interneuronas dl3 que expresan Sox5 (Martínez-Morales *et al.*, 2010).

Sería necesario determinar también si, en los embriones con niveles reducidos de Sox5 en la ventana tardía (HH14-HH24), la disminución en el número de interneuronas

dorsales (más dramática en dl2-dl3 y más sutil en dl1-dl4) se debe, no sólo a cambios en la especificación de los progenitores dorsales, sino a la muerte por apoptosis selectiva en esas poblaciones. En ese caso, Sox5 ejercería un control regionalizado de la supervivencia celular de las interneuronas dorsales.

En conclusión, Sox5 es necesario a lo largo del desarrollo de la diferenciación neural temprana para el control del número final de interneuronas dorsales.

Los análisis de las poblaciones de interneuronas en embriones con expresión ectópica de Sox5, realizados anteriormente en el laboratorio, demostraron que las poblaciones dl2, dl4, dl6, v0 y v2, que son *Lhx1/5*⁺, se diferencian prematuramente en la zona ventricular y no llegan a la zona del manto, pues mueren por apoptosis, antes de diferenciarse. Es decir, los progenitores con elevados niveles de Sox5 salen de ciclo prematuramente pero son incapaces de completar el programa de diferenciación correctamente y mueren (Martinez-Morales *et al.*, 2010). Por lo tanto, cuando se electroporan conjuntamente Sox5 y Bcl2 no se recuperan los niveles normales de interneuronas (Martinez-Morales *et al.*, 2010). Por ese motivo, no es posible determinar si los niveles elevados de Sox5 producen cambios en la especificación de las diferentes subpoblaciones de interneuronas dorsales.

6. Sox5 controla la especificación de los progenitores dorsales modulando la vía de Wnt

Las alteraciones observadas en la formación del patrón dorsal en los embriones con expresión ectópica de Sox5, como la disminución de los progenitores *Cath1*⁺ y *Ngn1*⁺ (dp1 y dp2, respectivamente), coinciden con las descritas en los ratones dobles nulos para Wnt1 y Wnt3a (Muroyama *et al.*, 2002). Además, el incremento de los progenitores *Cath1*⁺ (dp1) en embriones con niveles reducidos de Sox5, recuerda al que se observa en experimentos de exceso de función de la vía de Wnt (Ille *et al.*, 2007). Para determinar si Sox5 podría estar interfiriendo con la vía de Wnt en el control de la identidad dorsal se analizó la actividad de la vía de Wnt mediante diversos abordajes funcionales que a continuación se detallan.

6.1. Sox5 reduce la actividad de la vía canónica de Wnt

Con el objetivo de analizar la interacción entre Sox5 y la vía canónica de Wnt en el contexto de la especificación de los progenitores dorsales, se realizaron experimentos de

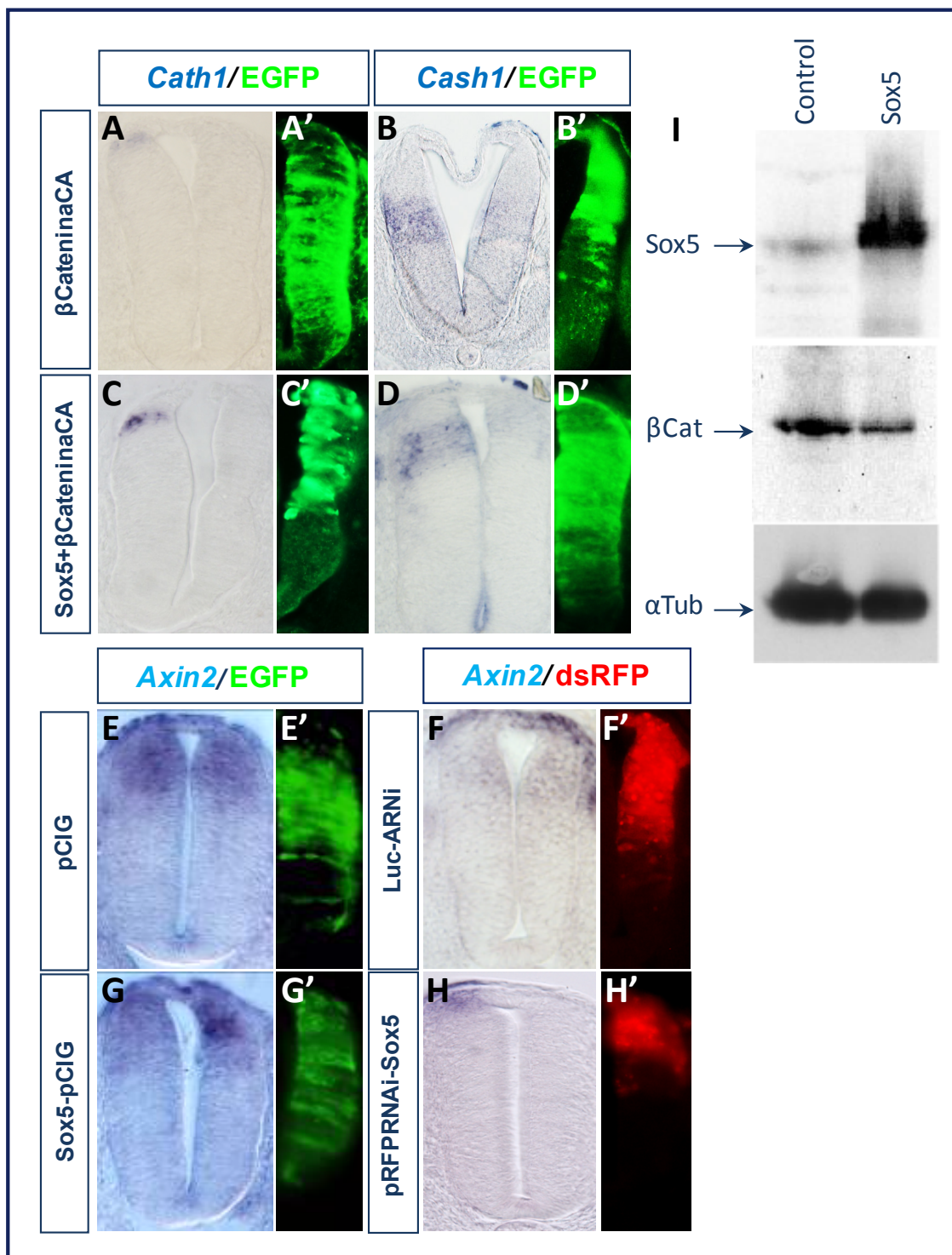


Fig. 20. Sox5 reduce la actividad vía de Wnt en la región dorsal del tubo neural. Los embriones de pollo se electroporaron con β -catenina^{CA}-pCIG, Sox5-pCIG, pCIG, Luc-RFPRNAi o Sox5-RFPRNAi en estadio HH11 y se analizaron 30 PE en estadio HH17-18 mediante hibridación *in situ* (A-H') e inmunohistoquímica (A-E', G,G'). En embriones con sobre-activación de la vía de Wnt se produce una disminución de la expresión de *Cath1* y *Cash1* en el hemitubo electroporado con respecto al lado control sin electroporar (A-B'). La expresión ectópica de Sox5 y β -catenina^{CA} produce una disminución más drástica de la expresión de *Cath1* y *Cash1* en el hemitubo electroporado en relación con el contralateral sin electroporar (C-D'). (G,G') La sobre-expresión de Sox5 produce un aumento de la expresión de *Axina2* en relación con el control electroporado con pCIG (E,E'). De forma complementaria, en embriones con niveles reducidos de Sox5 se produce una disminución de la expresión de *Axina2* (H,H') en comparación con los embriones control electroporados con Luc-RFPRNAi (F,F'). (I) En los análisis de *western blot* de embriones con exceso de función de Sox5 se produjo una disminución de β -catenina activada. (G,G'; I,I') Modificadas de Martínez-Morales *et al.*, 2010.

exceso de función de β -catenina usando una forma constitutivamente activa que contiene la mutación S33Y, lo cual impide la fosforilación necesaria para su reconocimiento por parte de APC y, por tanto, para su degradación (β -catenina^{CA}; Tetsu & McCormick, 1999). La expresión ectópica de β -catenina^{CA} a lo largo de todo el eje D-V del tubo neural en embriones de estadio HH11 provocó una disminución de la expresión de los marcadores de progenitores dorsales *Cath1* y *Cash1* en relación con el hemitubo no electroporado 30 horas PE (Fig. 20A-B'). Esta reducción es similar a la descrita en embriones de ratón transgénicos que expresan, bajo el control del promotor de Wnt1, una forma constitutivamente activa de β -catenina que carece del tercer intrón, donde residen las serinas fosforilables (Ille *et al.*, 2007). La sobre-expresión conjunta de β -catenina^{CA} y Sox5 produjo un efecto más drástico sobre la disminución de la expresión de *Cath1* y *Cash1* (Fig. 20C-D') que la de β -catenina^{CA} sola. Esto puede deberse a que la expresión ectópica masiva de β -catenina no pueda ser compensada, en este contexto, por la actividad de Sox5 en la reducción de la actividad de la vía de Wnt. No obstante, en el caso de otras dianas directas de la ruta de Wnt como *Ciclina D1* y *N-Myc* sí ha podido observarse que Sox5 contrarresta la actividad de β -catenina y produce una disminución de su expresión en electroporaciones conjuntas de Sox5 y β -catenina^{CA} (Martinez-Morales *et al.*, 2010).

Para determinar si los niveles elevados de Sox5 alteraban la actividad de la vía de Wnt, se analizó directamente el estado de activación de la vía de Wnt utilizando un anticuerpo específico contra la forma activa no fosforilada de β -catenina en ensayos de *western blot*. En embriones electroporados con Sox5-pCIG en el tubo neural se observó una disminución de un 51% en los niveles de β -catenina activa 24 horas PE (Fig. 20I; Martinez-Morales *et al.*, 2010). Estos resultados demuestran que la expresión elevada y ectópica de Sox5 reduce la actividad de la vía canónica de Wnt en el tubo neural.

6.2. Sox5 interacciona directamente con β -catenina

Se han descrito varios contextos en los que los factores de transcripción Sox controlan la vía de Wnt mediante interacción directa con β -catenina. Este es el caso de Sox9 que se une a β -catenina durante la condrogénesis y provoca una disminución de la expresión de *Ciclina D1* (Akiyama *et al.*, 2004). Además, Sox6 se une directamente a β -catenina en células β pancreáticas bloqueando su actividad transcripcional (Iguchi *et al.*, 2007). Por todo ello, decidimos explorar la posibilidad de que Sox5 y β -catenina puedan interaccionar de forma directa.

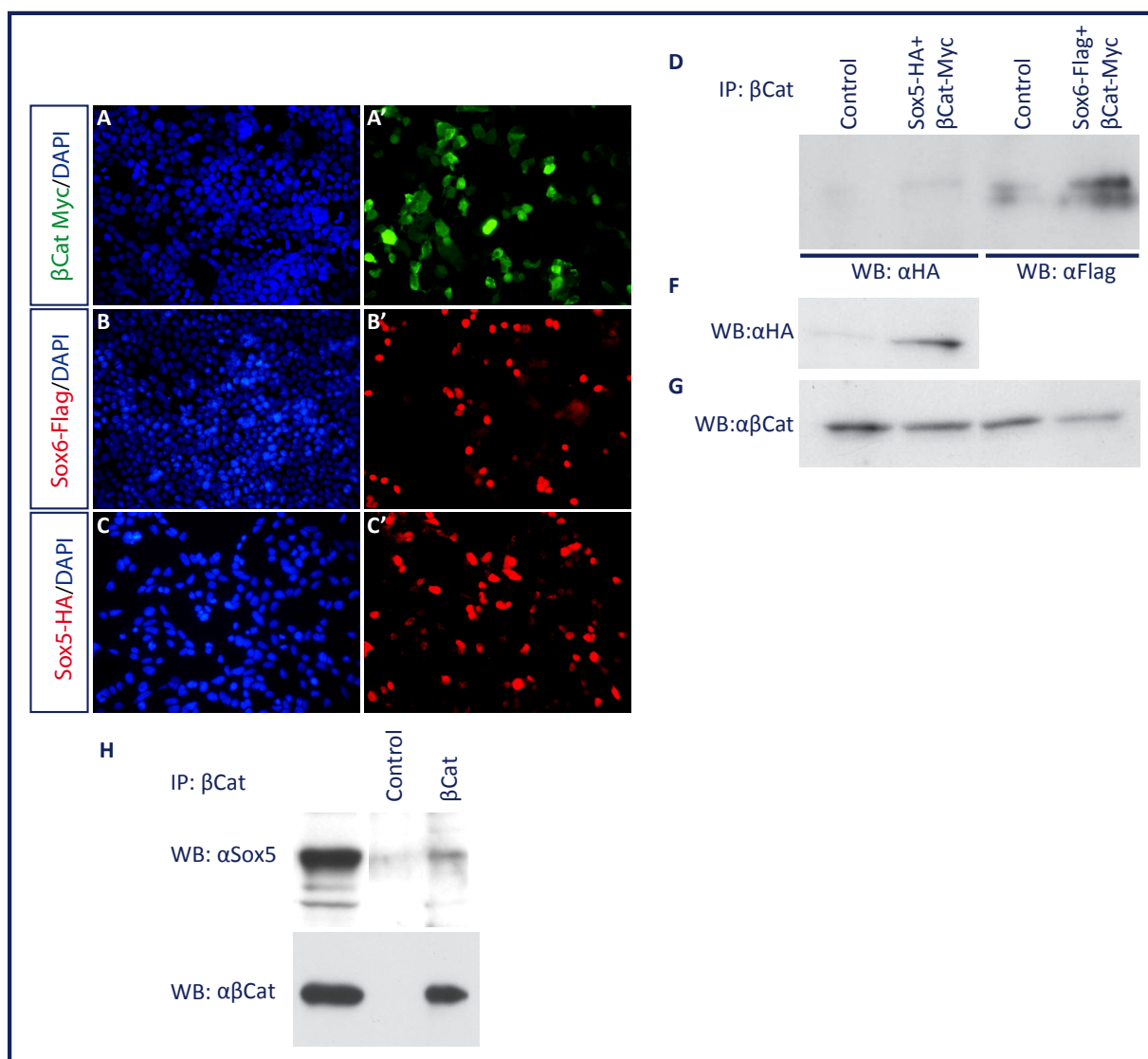


Fig. 21. Sox5 interacciona con β -catenina en el tubo neural. Análisis por inmunocitoquímica de las células HEK 293 transfectadas con β -catenina-Myc (A,A'), Sox6-Flag (B,B') y Sox5-HA (C,C'). (D) Ensayo de coimmunoprecipitación de Sox5+ β -catenina y Sox6+ β -catenina con el anticuerpo α Mo β -catenina (BD) y revelado con α HA (carriles 1 y 2) y con α Flag (carriles 3 y 4) en el cual se observa la inmunoprecipitación de Sox6. *Western blot* de los extractos antes de inmunoprecipitar revelado con α HA (F) y $\alpha\beta$ -catenina (G). En embriones de pollo de estadio HH11 se electroporó pCIG o Sox5-pCIG, a las 24 PE se realizó una inmunoprecipitación con el anticuerpo α Mo β -catenina (BD) y se reveló con anticuerpos anti-Sox5 y anti- β -catenina para detectar la presencia de Sox5 en el complejo.

Para ello se realizaron experimentos de coimmunoprecipitación (CoIP) previa transfección de la línea celular HEK 293 con plásmidos de expresión (pCDNA3) de las proteínas de fusión β -catenina- Myc, Sox5-HA y Sox6-Flag. La eficacia de la transfección se comprobó mediante inmunocitoquímica utilizando anticuerpos contra Myc, HA y Flag (Fig. 21A-C). Las células para la CoIP se transfectaron con Sox5- HA y β -catenina-Myc. En paralelo, y como control positivo, se transfectaron células con plásmidos de expresión de las proteínas de fusión Sox6 -Flag y β -catenina-Myc, dado que se ha descrito la interacción de estas dos proteínas en células β pancreáticas (Iguchi *et al.*, 2007).

La IP se realizó utilizando un anticuerpo monoclonal contra la proteína β -catenina y la detección de la interacción con Sox5 o con Sox6 mediante los anticuerpos específicos para HA y Flag, respectivamente. En *western blot* se detectó la presencia de Sox6 tras la IP de β -catenina (Fig. 21D). Sin embargo, no se detectó Sox5 en el inmunoprecipitado con β -catenina, a pesar de confirmar la existencia de Sox5-HA en el extracto celular previo a la IP (Fig. 21E). La presencia de β -catenina se comprobó en los extractos celulares de partida mediante *western blot* (Fig. 21F). Se intentó también realizar la IP utilizando el anticuerpo contra la proteína de Sox5 de pollo generado en el laboratorio, y revelando el *western blot* resultante con el anticuerpo específico para anti- β -catenina, pero tampoco se observó inmunoprecipitación del complejo (datos no mostrados).

Dado que el contexto celular puede ser importante para que se produzca la interacción entre las proteínas Sox y β -catenina, decidimos explorar esta interacción en las células del tubo neural del embrión de pollo de estadio HH11. Para ello, se electroporó β -catenina-pCIG y como control el plásmido pCIG. El lisado celular se inmunoprecipitó con el anticuerpo monoclonal anti- β -catenina y el *western blot* se reveló con el anticuerpo policlonal contra Sox5 generado en el laboratorio. De este modo se pudo demostrar la presencia de la proteína Sox5 endógena en el complejo IP con anti- β -catenina en células del tubo neural de embrión de pollo (Fig. 21H).

Sin embargo, no se ha podido realizar la CoIP contraria, es decir, utilizando el anticuerpo contra Sox5 para la inmunoprecipitación, ya que éste no funciona para IP. Sería necesario realizar los experimentos electroporando una construcción de Sox5-HA en vectores pCIG para así utilizar anticuerpos que funcionan en IP. En conclusión, datos preliminares apuntan que Sox5 podría interferir con la vía canónica de Wnt en el tubo neural, en parte a través de la interacción directa con β -catenina.

6.3. Sox5 es necesario para la expresión de *Axina2*

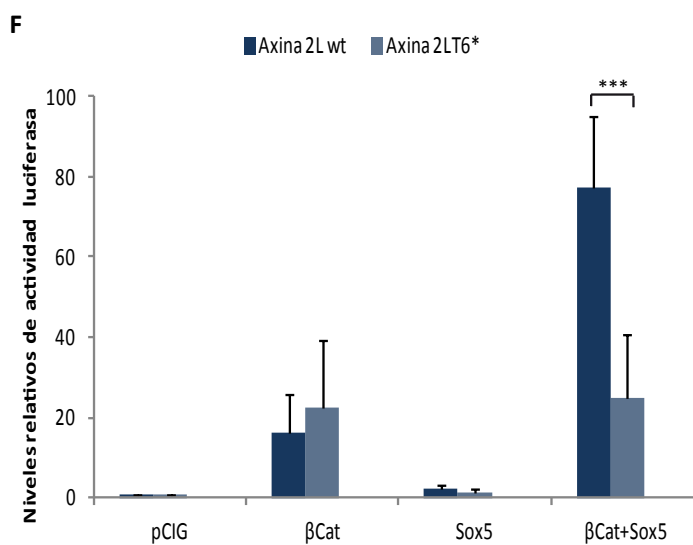
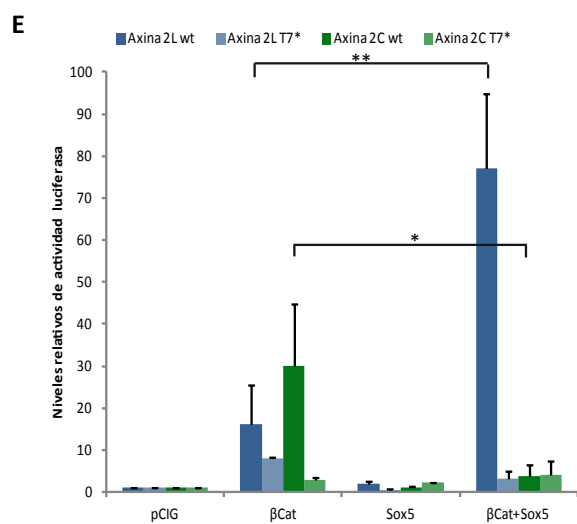
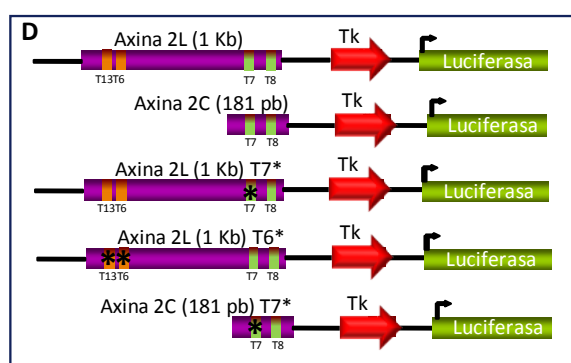
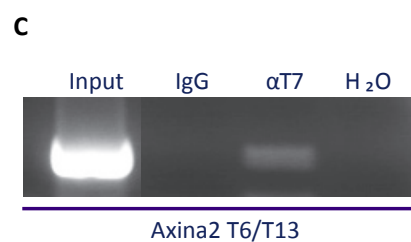
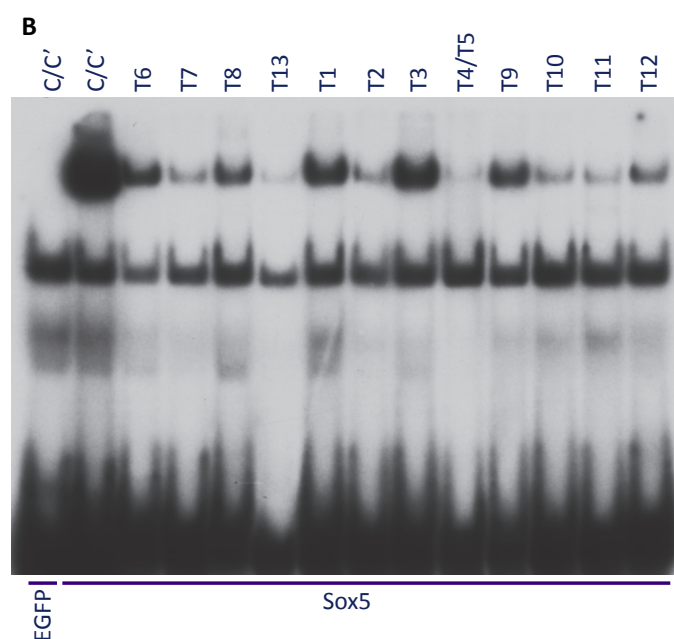
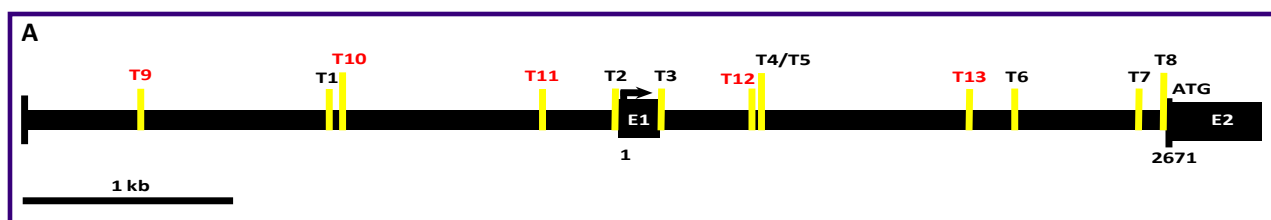
En el tubo neural la actividad de la vía Wnt en la zona dorsal se refleja en la expresión de *Axina2*, diana directa y a la vez regulador negativo de la vía, en los progenitores dorsales (Lustig *et al.*, 2002; Qian *et al.*, 2011). Puesto que en la región dorsal del tubo neural también se expresa Sox5, decidimos explorar si Sox5 podría estar interfiriendo con la vía de Wnt mediante el control del patrón de expresión de *Axina2*. La expresión ectópica de Sox5 en embriones de HH11 produjo un incremento de la expresión de *Axina2* (Fig. 20G) en el tubo neural dorsal en relación con los embriones control electroporados con pCIG (Fig. 20E; Martinez-Morales *et al.*, 2010).

De forma complementaria, la reducción de los niveles de Sox5 en embriones electroporados con Sox5-RFPRNAi produjo una drástica reducción de la expresión de *Axina2* (Fig. 20H) en comparación con los embriones electroporados con Luc-RFPRNAi (Fig. 20F). Por lo tanto, Sox5 es necesario para la expresión de *Axina2* y, a través de su activación, podría restringir la actividad dorsal de la vía de Wnt.

6.4. Sox5 se une a trece sitios conservados de las regiones reguladoras de *Axina2*

Como se ha mencionado anteriormente, en la vía canónica de Wnt el efector final de la señalización encargado de la regulación transcripcional es el complejo β -catenina/Tcf (Logan & Nusse, 2004). Uno de los genes diana de la vía de Wnt es *Axina2* que, como hemos mencionado, es un regulador negativo de la vía al formar parte (y ser el elemento de concentración limitante) del complejo de degradación de β -catenina (Clevers & Nusse, 2012). La transcripción de *Axina2* está regulada por unión de Tcf/Lef a sitios conservados distribuidos en una región reguladora de 5,6 kpb que comprende el promotor (dos sitios de unión) y el primer intrón de *Axina2* (seis sitios de unión; Jho *et al.*, 2002). Además, la región presenta una conservación del 80% entre los genes de ratón y humano. En este fragmento se ha descrito la existencia de 8 sitios de unión para Tcf (T1-T8; Fig. 22A, negro). Mediante ensayos de actividad luciferasa, se ha demostrado la activación transcripcional de *Axina2* mediada por la unión de Tcf/ β -catenina a los diferentes sitios de unión; de ellos, son especialmente importantes los sitios T6, T7 y T8. Además, esta actividad se reduce de manera drástica al eliminar el intrón de 1 kpb que contiene 6 sitios (T3-T8; Jho *et al.*, 2002; Leung *et al.*, 2002).

Fig. 22. La unión de Sox5 a un sitio conservado en el primer intrón de *Axina2* es necesaria para la activación cooperativa de Sox5 y β -catenina de la transcripción de *Axina2*. (A) Sitios de unión para Sox conservados presentes en el promotor y el primer intrón de *Axina2* (T1-T13). Los sitios T1-T8 (negro) ya habían sido descritos anteriormente en Jho *et al.*, 2002 como sitios de unión para Tcf. Los sitios T9-T13 (rojo) han sido identificados en este trabajo. (B) La capacidad de Sox5 de unirse a los 13 sitios conservados se analizó mediante EMSA. El control C/C' es un sitio dimérico de unión de SoxD y SoxE descrito en el promotor de MPZ. (C) Inmunoprecipitación de extractos de células B16 transfectadas con Sox5-T7 realizada en ausencia de anticuerpos (H_2O), anticuerpos control (IgG) o anticuerpo $\alpha T7$. (D) Representación esquemática de las construcciones reporteras utilizadas en los ensayos de actividad luciferasa. (E) Embriones de pollo electroporados en HH11 con las distintas construcciones de *Axina2* y analizados 24 PE. Análisis cuantitativo de la actividad transcripcional de Sox5 solo o con β -catenina^{CA} en las construcciones de *Axina2* largas, cortas y con el sitio T7 mutado. (F) Análisis de la actividad transcripcional de Sox5 y Sox5+ β -catenina^{CA} en la construcción de *Axina2* con el sitio T6/T13 mutado. Las gráficas muestran unidades de actividad luciferasa relativas al control electroporado con pCIG. Cada una de las barras representa la media \pm desviación típica de al menos 4 experimentos con 4 embriones cada uno. * $p < 0,05$, ** $p < 0,02$, *** $p < 0,01$.



Para explorar la posibilidad de que Sox5 controle la transcripción de *Axina2* a través de la región reguladora de 5,6 kpb, se realizó una búsqueda *in silico* utilizando la base de datos USCS Genome Bioinformatics (<http://genome.ucsc.edu/>) de posibles sitios de unión de Sox5 conservados entre las secuencias de ratón y humano, considerando el motivo (A/T)(A/T)CAA(A/T)G como posible sitio de unión. Puesto que las proteínas Sox y las Tcf pertenecen a la superfamilia HMG, reconocen secuencias consenso en el ADN muy similares (Bowles *et al.*, 2000). Por ello, además de los 8 sitios descritos para Tcf, que también pueden ser sitios de unión para genes Sox, se identificaron otros 5 posibles sitios de unión (T9-T13; Fig. 15A, rojo) conservados.

Para determinar si Sox5 es capaz de unirse a alguno de los 13 sitios, se realizaron ensayos de movilidad electroforética (EMSA). En estos estudios se analizó la capacidad de la proteína completa de pollo de Sox5 (procedente de extractos de células HEK293 transfectadas) de unirse a oligonucleótidos de 33 pb marcados con ³²P, que contienen cada uno de los 13 sitios de unión predichos. Los ensayos de EMSA permitieron determinar que Sox5 es capaz de unirse *in vitro* a los 13 sitios de unión con diferentes afinidades (Fig. 22B). Pero lo más importante es que 3 de los sitios que presentan una afinidad de unión de Sox5 media/alta (T6, T7 y T8), se encuentran localizados en el fragmento de 1 kpb dentro del primer intrón de *Axina2* que ya habíamos identificado como una región importante para la activación de la transcripción de *Axina2* por Sox5 (Martinez-Morales *et al.*, 2010).

6.5. Sox5 participa en la regulación transcripcional de *Axina2*

Mediante ensayos de actividad luciferasa se ha demostrado que el complejo Tcf/ β -catenina activa la transcripción de *Axina2* a través de una región reguladora de 1 kpb dentro del primer intrón de *Axina2*. Mediante mutaciones puntuales se ha establecido que esta activación está mediada por el sitio de unión para Tcf T7 (Fig. 22D,E Axina 2L T7*; Leung *et al.*, 2002; Martinez-Morales *et al.*, 2010). Además, en presencia de Sox5 se produce una activación cooperativa entre ambas proteínas de la transcripción de *Axina2* (Fig. 22D,E Axina 2L; Martinez-Morales *et al.*, 2010). Con el fin de determinar la importancia de los sitios T6 y T8, a los cuales Sox5 también se une con gran afinidad, se realizaron delecciones y mutaciones puntuales. La eliminación de un fragmento de 856 pb de la región del primer intrón de *Axina2*, que incluye los sitios T6 y T13 (Fig. 22D,E, Axina2C) provocó la desaparición de la activación cooperativa de *Axina2* por parte de Sox5 y β -catenina en tubos neurales de embriones electroporados en estadio de HH11-

12 (Fig. 22D). Puesto que esta aproximación suponía la eliminación de un fragmento de gran tamaño con sitios de unión posiblemente relevantes para otros factores de transcripción, se realizaron mutaciones puntuales de los sitios T6 y T13 (Fig. 22D, *Axina2L T6**). Las mutaciones de los sitios T6/T13 impidieron también la actividad sinérgica de Sox5 sobre la transcripción de *Axina2* mediada por Tcf/ β -catenina (Fig. 22F).

6.6. Sox5 se une *in vivo* a los sitios T6/T13 en el primer intrón de *Axina2*

De los tres sitios (T6, T7, T8) presentes en la región 1 kpb del primer intrón de *Axina2* que media la inducción transcripcional dependiente de Sox5 (Martinez-Morales *et al.*, 2010; ver sección 6.7), se ha descrito que T7 es requerido en la activación transcripcional mediada por Tcf (Leung *et al.*, 2002), mientras que T8 no es suficiente para dirigir la activación transcripcional en presencia de Sox5 y β -catenina^{CA}, como veremos en la sección 6.7. Para determinar si el sitio T6 es capaz de mediar la unión de Sox5 *in vivo* se realizaron experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) en cultivos celulares de la línea de melanocitos B16 transfectados con una construcción con la proteína de fusión de ratón Sox5-T7 en pCMV. Como control se transfectaron células con EGFP-pCMV. La IP se realizó utilizando bolitas de proteína A sefarosa y el anticuerpo que reconoce T7. Mediante PCR, se comprobó que Sox5 era capaz de unirse a un fragmento de 290 pb en el primer intrón de *Axina2* que contiene los sitios de unión T6 y T13 (Fig. 22C). La técnica utilizada no nos permitió distinguir entre ambos sitios puesto que únicamente se encuentran separados por 220 pb. Como control negativo se utilizó una pareja de oligonucleótidos que por PCR amplifica una región de 300 pb que se encuentra 10 kpb antes del inicio de transcripción de *Axina2*.

Aunque la técnica de ChIP utilizada no nos permite distinguir entre la unión a los sitios T6 y T13, se han realizado experimentos de actividad luciferasa preliminares utilizando una construcción de *Axina2L* con una mutación puntual en el sitio T13. En ellos, tampoco se ha observado activación sinérgica de la transcripción de *Axina2* con β -catenina y Sox5 (datos no mostrados). Es decir, Sox5 puede estar controlando la activación cooperativa de Sox5 y β -catenina a través de su unión a T6 o a T13.

En conjunto los resultados de los EMSAs, ChIPs y ensayos de actividad luciferasa demuestran que la unión directa de Sox5 al sitio T6/T13 del primer intrón de *Axina2* es necesaria para la potenciación de la actividad de β -catenina en la inducción de la transcripción de *Axina2* y, por tanto, en el bloqueo de la actividad de la vía de Wnt.

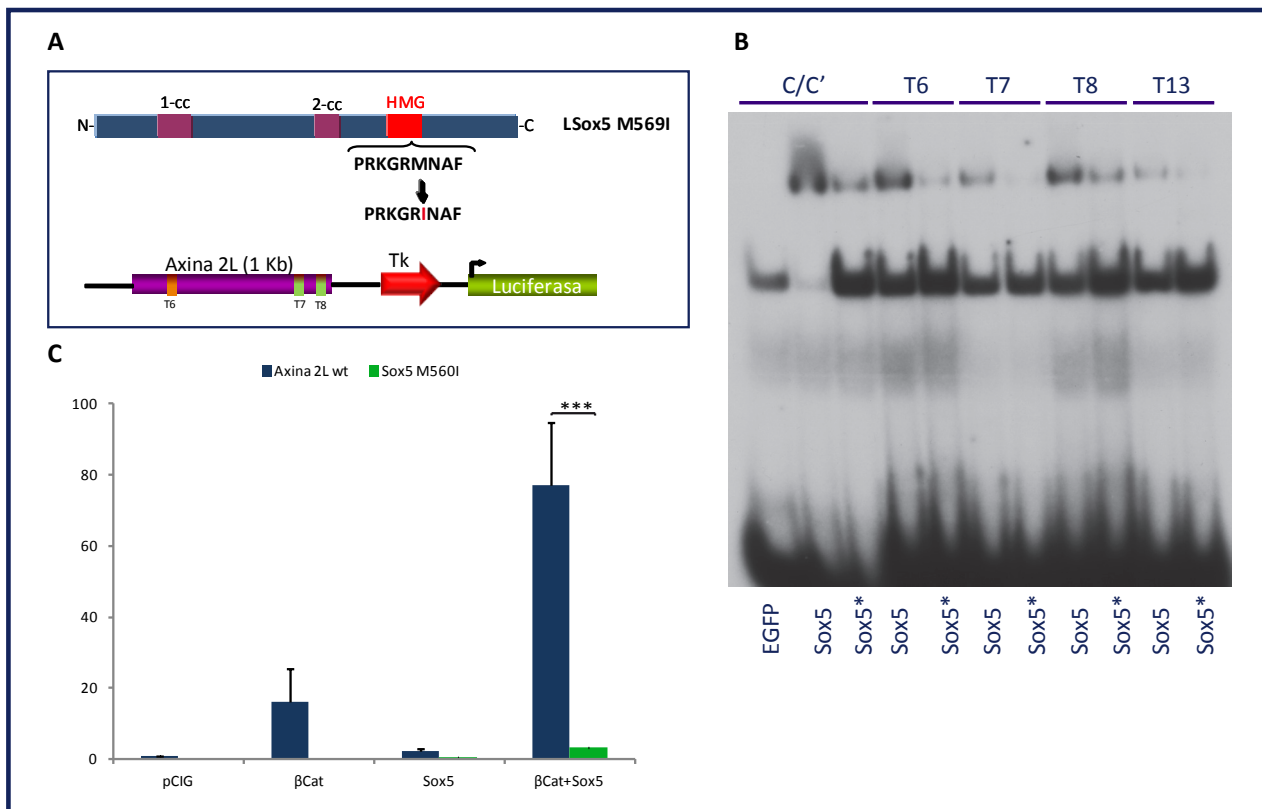


Fig. 23. Sox5^{M569I} se une al ADN con poca afinidad y no potencia la transcripción de Axina2. (A) Representación esquemática de la mutación Sox5^{M569I} basada en la mutación descrita en Sry que produce alteraciones en el ángulo de torsión del ADN y construcción de Axina2L utilizada en los ensayos de actividad luciferasa. (B) El análisis de la capacidad de unión mediante EMSA muestra que Sox5^{M569I} (Sox5*) presenta una menor afinidad que la forma larga de Sox5 de pollo por los sitios de unión T6, T7, T8, T13 del primer intrón de Axina2. (C) Embriones de pollo electroporados en estadio HH11 y analizados 24 PE en estadio HH14. Análisis cuantitativo de la actividad transcripcional de Sox5 o Sox5^{M569I} solas o combinadas con β-catenina sobre la región reguladora del primer intrón de Axina2. La sobre-expresión de Sox5^{M569I} no incrementa la actividad de β-catenina. Cada una de las barras representa la media ± desviación típica de al menos 4 experimentos con 4 embriones cada uno. ***p<0,01.

6.7. El mutante puntual Sox5^{M569I} tiene actividad dominante negativa

Las proteínas Sox se unen al ADN a través del dominio HMG. Se ha descrito que una mutación puntual en el dominio HMG del gen *Sry* (del residuo de metionina en la posición 64 por una isoleucina) produce una disminución del 13° en el ángulo de torsión del ADN y ocasiona reversión sexual en humanos (Murphy *et al.*, 2001). En el laboratorio se había generado una construcción de Sox5 de pollo con una mutación en la caja HMG equivalente a la descrita para *Sry* (Sox5^{M569I} -pCIG; oligonucleótidos en Tabla2). Para determinar si esta proteína es capaz de unirse al ADN se realizaron EMSAs utilizando extractos de células HEK 293 transfectadas con Sox5^{M569I} -pCIG y los oligonucleótidos para los cuatro sitios de unión de Sox del fragmento de 1 kpb del primer intrón de Axina2 (T6, T7, T8 y T13). En estos ensayos se detectó una manifiesta reducción en la unión de

Sox5^{M569I} a los 4 sitios analizados respecto a la proteína Sox5 silvestre (Fig. 23B). Para determinar si la capacidad de unión al ADN reducida de Sox5^{M569I} altera su actividad de potenciación de la transcripción de *Axina2*, se realizaron ensayos de actividad luciferasa usando la construcción de *Axina2* de 1 kpb (Fig. 23A). Sox5^{M569I} no sólo fue incapaz de aumentar la actividad transcripcional de β -catenina^{CA} en el control de la expresión de *Axina2*, sino que redujo esta actividad por debajo de los niveles de activación del complejo Tcf/ β -catenina (Fig. 23C).

Puesto que Sox5 puede formar homodímeros a través de los dominios *coiled-coil*, la proteína mutada Sox5^{M569I} podría secuestrar a la Sox5 endógena impidiendo su actividad transcripcional, y comportándose así como una forma dominante negativa que podría causar la reducción brusca de la actividad de β -catenina antes mencionada. Además, aunque desconocemos qué región de Sox5 interacciona con β -catenina, es posible que la proteína Sox5^{M569I} sea capaz de mantener esa interacción y que ésta pueda contribuir también a interferir con la actividad normal del complejo Tcf/ β -catenina.

En conclusión, es necesario que Sox5 se una al ADN para actuar sinérgicamente con β -catenina en la transcripción de *Axina2*.

7. Papel de Sox5 en la generación del patrón dorso-ventral en embriones de pez medaka

Existe una gran homología entre las proteínas de Sox5 de pollo, ratón y pez medaka (Fig. 24). La identidad entre las proteínas completas de pollo y ratón es de aproximadamente el 90% mientras que entre ellas y la proteína de medaka es del 60%.

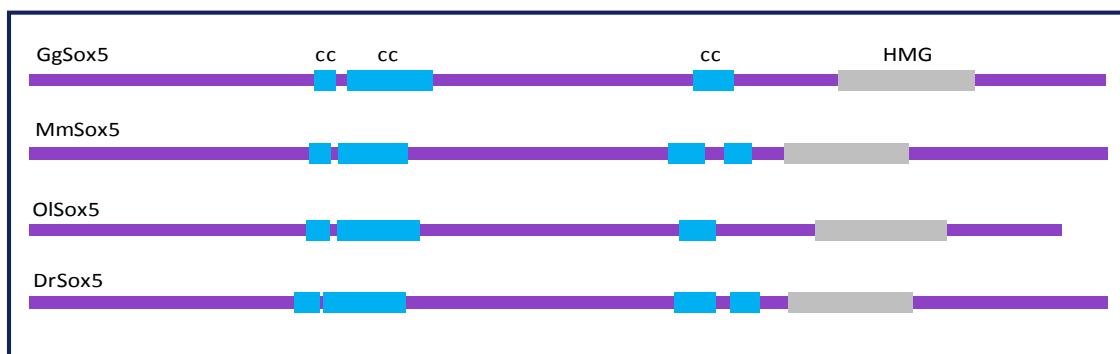


Fig. 24. Representación esquemática de las proteínas Sox5 de pollo, ratón, pez medaka y pez cebra. La posición de los principales dominios estructurales se encuentra conservada. Las proteínas de pollo y pez medaka presentan 3 dominios *coiled-coil* mientras que las de ratón y pez cebra tienen 4. En gris se representan las cajas HMG y en azul los dominios *coiled-coil* (cc).

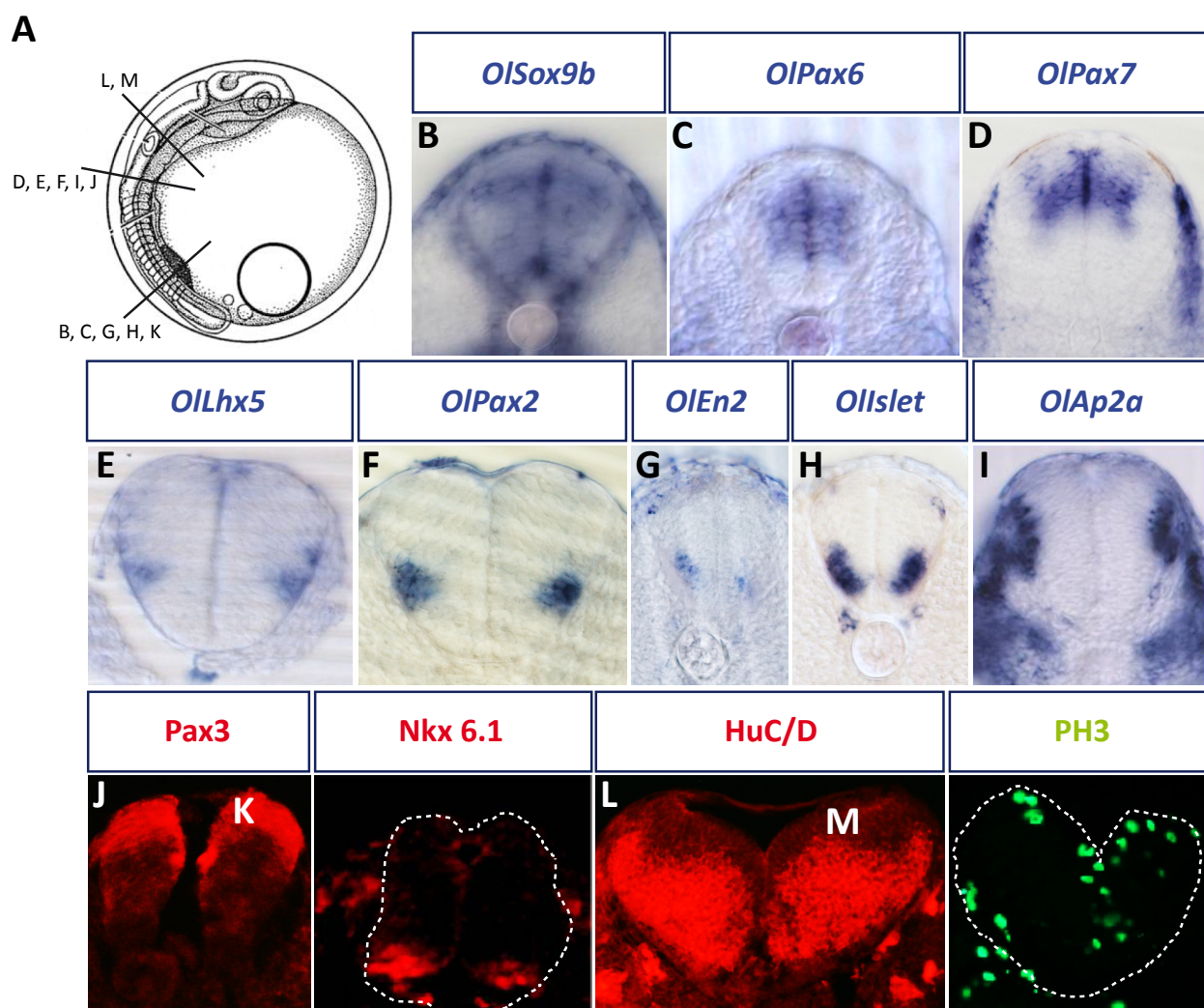


Fig. 25. Análisis de marcadores de diferentes poblaciones de progenitores y neuronas diferenciadas en embriones de pez medaka. (A) Representación esquemática de un embrión de pez medaka de 2 días de desarrollo en la que se señalan los niveles de corte de las imágenes (B-M). Análisis de marcadores mediante hibridación *in situ* (B-I) o inmunohistoquímica (J-M). Expresión de marcadores de progenitores en la zona ventricular: *Sox9b* (B), *Pax6* (C), *Pax7* (D), *Pax3* (J) y *Nkx6.1* (K). Expresión de marcadores de neuronas diferenciadas en la zona del manto: *Lhx5* (E), *Pax2* (F), *En2* (G) y *Islet* (H). *Ap2* es un marcador de CCN y de una población de interneuronas no identificada (I). Análisis del marcador panneural *HuC/D* (L) y del de proliferación *PH3* (M). (A) Modificada de Iwamatsu 2004.

Además, la organización de los dominios funcionales (caja HMG y dominios *coiled-coil*) es muy similar en las tres proteínas (Fig.24). Por todo ello decidimos utilizar el modelo de pez medaka para estudiar si la actividad de *Sox5* en el establecimiento del patrón D-V está conservada en vertebrados.

En primer lugar se caracterizó, con más detalle de lo hasta ahora publicado en medaka, la conservación del patrón D-V en la médula espinal. Para ello se realizaron hibridaciones *in situ* con diferentes marcadores que se expresan en dominios de

progenitores definidos en el eje D-V, caracterizados en ratón y en pollo pero no en medaka, como *Sox9*, *Pax6* y *Pax7* (Fig. 25A,D). Se analizaron también marcadores de neuronas diferenciadas como *Islet1* (dl3), *Lhx5* (dl2, dl4, dl6-v1), *Pax2* (dl4, dl6-v1), *En2* (v1) y *Ap2a* (CCN y una población de interneuronas que no hemos podido identificar; Fig. 25E-I). Además, mediante técnicas de inmunohistoquímica, se analizó la expresión de marcadores de progenitores dorsales como *Pax3* (dp1-vp2) y marcadores ventrales como *Nkx6.1* (vp2-vp3 y pMN; Fig. 25J-K). Para los estudios generales de proliferación y diferenciación se analizó la expresión de marcadores panneurales como *HuC/D* (Fig. 25L) y de marcadores de proliferación como *PH3*, que se expresa en aquellas células que se encuentran en fase M del ciclo celular (Fig. 25M).

El análisis de todos estos marcadores en conjunto nos permitió observar que, de manera aproximada, la expresión de estos factores de transcripción se encuentra conservada en pez medaka. Sin embargo, los diferentes dominios tanto de progenitores como de interneuronas se encuentran mucho más empaquetados (contienen un menor número de células) en el tubo neural de los embriones de medaka que en los de pollo y ratón, por lo que resulta más difícil determinar los límites de expresión de cada

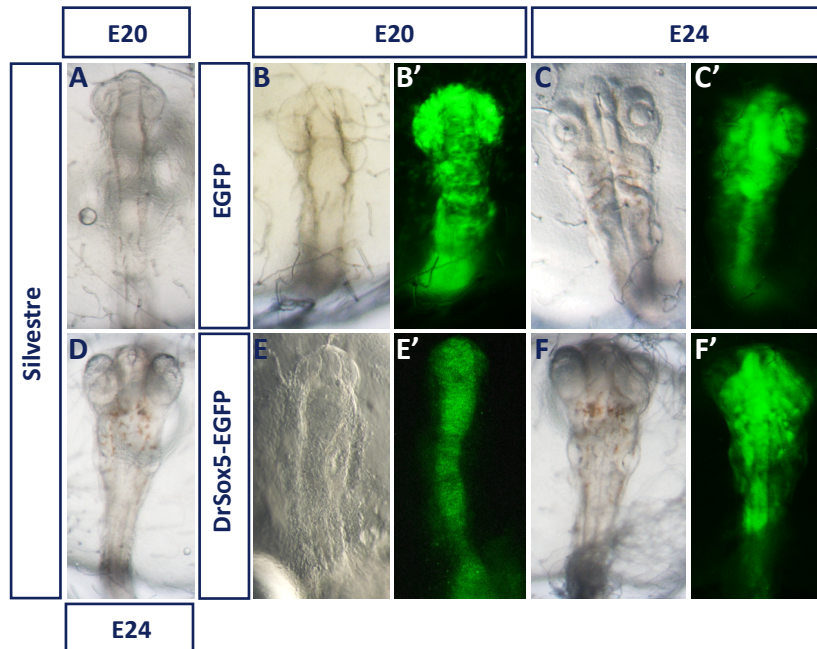


Fig. 26. La expresión ectópica de Sox5 en embriones de pez medaka no causa alteraciones morfológicas evidentes. Embriones de pez medaka de 1 (A-B', E,E') y 2 días de desarrollo (C-D, F,F'). No se producen malformaciones ni retrasos en el desarrollo en los embriones microinyectados con el ARNm de *DrSox5* (E-F') con respecto a los controles inyectados con ARNm de *EGFP* (B-C') o a los embriones silvestres (A, D).

una de estas proteínas, así como la región exacta en la cual se expresan. Además, el empaquetamiento también dificulta la distinción entre la zona ventricular y la del manto del tubo neural.

7.1. La sobre-expresión de Sox5 provoca un incremento de las interneuronas dorsales dl3

Con el fin de determinar si la expresión ectópica de Sox5 mantenida en todo el tubo neural alteraba el patrón D-V de las poblaciones de progenitores y neuronas en pez medaka, se realizaron experimentos de sobre-expresión de Sox5 mediante microinyección en embriones de estadio de dos células. Se inyectó el ARNm de Sox5 de pez cebra (*DrSox5*) puesto que la homología entre las proteínas de medaka y pez cebra es del 71% (95% para el dominio HMG; Fig. 24). La construcción del ARNm presenta como reportero EGFP en el plásmido pCS2+ para monitorizar la microinyección (Fig. 26). La expresión ectópica de Sox5 en embriones de hasta 4 días de desarrollo no provocó un incremento de la mortalidad de los embriones, ni alteraciones morfológicas evidentes (diferencias en cuanto al número de somitas o malformaciones) o retrasos en el desarrollo de los embriones microinyectados (Fig. 26E-F') con respecto a los embriones control inyectados con el ARNm de *EGFP* (Fig. 26B-C') o a los no inyectados (Fig. 26A,D).

En los embriones inyectados con bajas concentraciones de ARNm de *DrSox5* (100 ng/μl) y analizados en estadio 24 (30 horas de desarrollo) no se observó ninguna diferencia en la extensión de los dominios de expresión de marcadores de interneuronas como *Islet* (Fig. 27E) o *Lhx5* (Fig. 27F) en relación con los controles inyectados con *EGFP* (Fig. 27A-B). Sin embargo, en embriones inyectados con ARNm de Sox5 a 250 ng/μl se observó una disminución en el número de las interneuronas dorsales dl4-dl6 que expresan *Pax2* (Fig. 27G; n=5/5) y un incremento en la población de interneuronas dl3 *Islet1*⁺ (Fig. 27H; n=4/7) con respecto a los controles (Fig. 27C,D). Estas variaciones se analizaron también calculando el área de tubo neural que expresa cada uno de estos marcadores en relación con el área total del tubo. Se observó un aumento estadísticamente significativo del área de expresión de *Islet*, correspondiente con la población de interneuronas dl3, y una ligera disminución, aunque no significativa, de las motoneuronas (Fig. 27N). No se detectó variación significativa en el área de expresión de *Pax2* (Fig. 27M), pero es probable que esto se deba a que no se ha analizado un número suficiente de embriones.

Asimismo, en embriones de 4 días de desarrollo con sobre-expresión de Sox5 se detectó expresión ectópica ventral de *Pax2* en el romboencéfalo (Fig. 27K) en relación

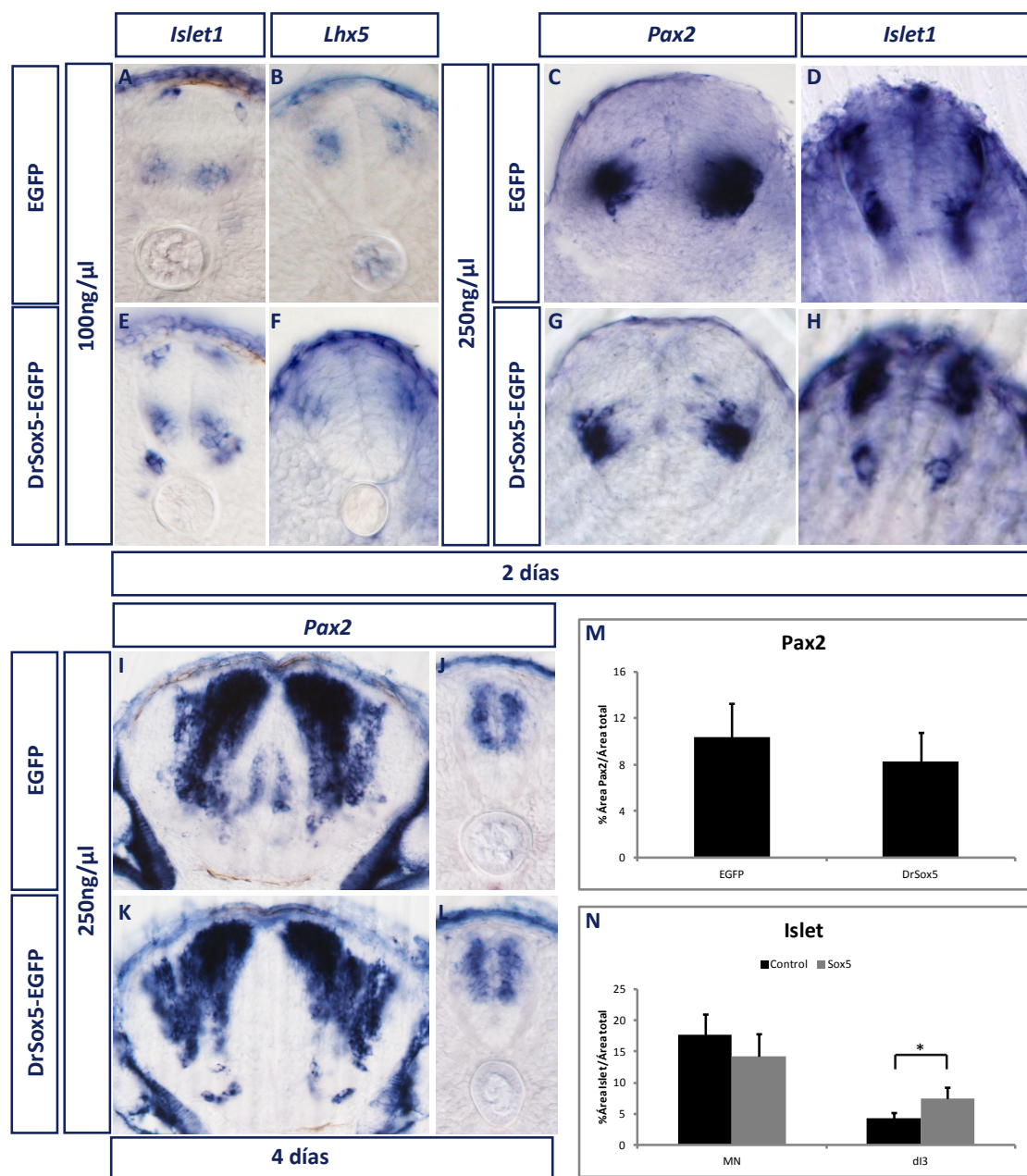


Fig. 27. Niveles elevados de Sox5 producen alteraciones en la especificación de las interneuronas. Embriones de pez medaka microinyectados con el ARNm de *DrSox5* (E-H, K,L) o de *EGFP* (A-D, I,J) en estadio de dos células y analizados a 2 (A-H) y 4 días de desarrollo (I-L) mediante hibridación *in situ*. En embriones de 2 días microinyectados con 100 ng/ μ l de *DrSox5* no se observa alteración de la expresión de *Islet* (E) ni de *Lhx5* (F) en relación con los embriones control inyectados con *EGFP* (A,B). Se produce una disminución de la expresión de *Pax2* (G) y un incremento de la *Islet* (H) en embriones microinyectados con 250 ng/ μ l de *DrSox5* con respecto a los embriones control (C,D). En embriones de 4 días microinyectados con 250 ng/ μ l se produce una disminución de la expresión de *Pax2* en la zona ventricular del romboencéfalo (K) pero no hay diferencias en las zonas caudales (L) en comparación con los controles (I,J). Área de expresión de *Pax2* (M) y *Islet* (N) en relación con el área total del tubo neural en embriones microinyectados con *EGFP* y *DrSox5* en embriones de 2 días de desarrollo. Las áreas de han analizado utilizando el software ImageJ y la comparación estadística mediante t de Student. * $p < 0.05$.

con el control (Fig. 27I), mientras que no se observaron alteraciones en la expresión de *Pax2* en las interneuronas de las regiones troncales del tubo neural (Fig. 27J,L). En secciones muy caudales se observó expresión de *Pax2*, tanto en los embriones salvajes como en los microinyectados, en progenitores neurales de la zona ventricular. Esta expresión no ha sido descrita para *Pax2* en embriones de ratón (Nornes *et al.*, 1990).

En conclusión, los análisis de exceso de función de Sox5 en pez medaka mostraron un aumento en la población de interneuronas dl3, mientras que se observa una disminución de las poblaciones intermedias dl4-dl6.

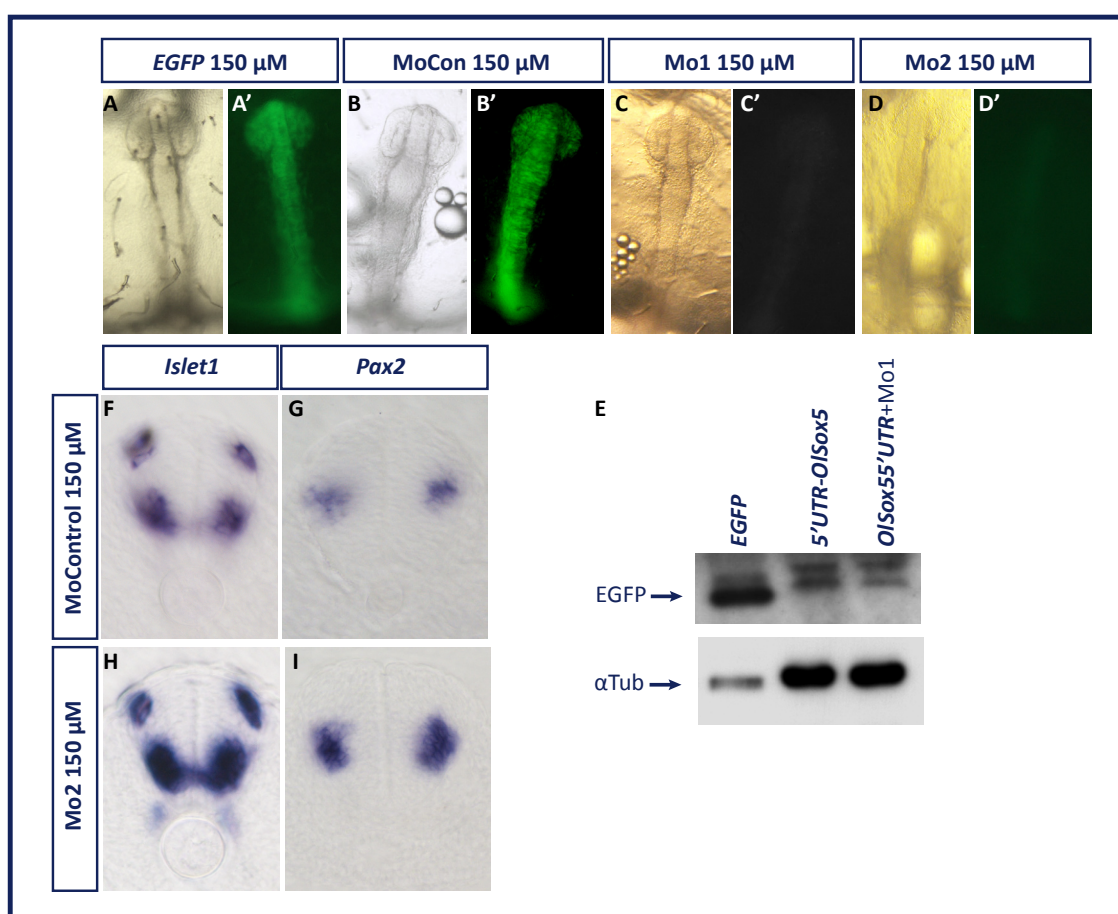


Fig. 28. Los morfolinolinos específicos para reducir los niveles de Sox5 en embriones de pez medaka no causan alteraciones morfológicas, ni cambios en marcadores de progenitores y de neuronas. Embriones microinyectados con el ARNm del control 5'UTR-OISox5 (5'UTR; A,A') y del control con cada uno de los morfolinolinos: MoCon (B,B'), Mo1 (C,C') y Mo2 (D,D') a 150 μM. A 1 día de desarrollo se observa una drástica reducción de los niveles de EGFP en los embriones tratados con los morfolinolinos Mo1 y Mo2 (C-D') con respecto al morfolino control MoCon (B,B') y al control sin morfolino (A,A'). (F,I) Análisis de marcadores de neuronas mediante hibridación *in situ* en embriones de 2 días de desarrollo. En los embriones inyectados con el Mo2 no se observa ninguna alteración de la expresión de *Islet* (H) ni *Pax2* (I) con respecto a los microinyectados con el MoCon (F,G). (E) Western blot de embriones de 1 día de desarrollo. La microinyección de Mo1 junto con el ARNm control produce una disminución de la expresión de EGFP.

Aunque no se han hecho análisis de proliferación y de diferenciación usando marcadores panneurales, en medaka la sobreexpresión de Sox5 no parece provocar la salida prematura de ciclo, y consecuente pérdida general de interneuronas, que provoca la expresión ectópica de Sox5 en el tubo neural de pollo (Martinez-Morales *et al.*, 2010).

En embriones de pollo con exceso de función de Sox5 no se ha podido realizar un análisis pormenorizado de las diferentes poblaciones de interneuronas debido a que la expresión ectópica en estos casos impide la correcta diferenciación de las interneuronas (Martinez-Morales *et al.*, 2010). Esto provoca que, al contrario de lo que sucede en medaka, se observe una disminución generalizada de todas las poblaciones de interneuronas. El incremento observado en el número de interneuronas de la población dl3 en peces inyectados con ARNm de Sox5 parece reforzar la idea de la importancia de Sox5 para la especificación de las interneuronas dl3, ya que Sox5 es necesario para la especificación correcta de los progenitores dp3 en el tubo neural de pollo (Fig. 15), y para la supervivencia de las interneuronas dl3 diferenciadas (Martinez-Morales *et al.*, 2010).

7.2. Experimentos de falta de función

De forma complementaria, se realizaron experimentos de falta de función de Sox5 utilizando dos oligonucleótidos antisentido tipo morfolino diferentes (Mo1 y Mo2). Los morfolinós son oligonucleótidos de 22 pares de bases modificados que reconocen una secuencia de la zona 5'UTR del gen de Sox5 de medaka y de la región del inicio de transcripción, y actúan bloqueando la transcripción (Nasevicius & Ekker, 2000). Con el fin de comprobar la eficiencia de los morfolinós se generó una construcción control que contenía 32 pb del 5'UTR junto con 26 pb de la región codificante de Sox5 de medaka (regiones diana para los dos morfolinós) fusionada con la secuencia codificante para EGFP en el vector pCS2+ (5'UTR-OISox5-pCS2+). Para determinar la efectividad de los dos morfolinós se inyectó el ARNm procedente de la construcción control 5'UTR-OISox5-pCS2+ junto con el morfolino control (MoCo), que tiene la misma secuencia que el morfolino1 (Mo1) pero con 5 bases diferentes, o con cada uno de los dos morfolinós a diferentes concentraciones (150 μ M y 200 μ M) y se analizaron los embriones en estadio 20 y 24 (30 horas y 4 somitas, y 44 horas y 16 somitas de desarrollo, respectivamente). Se observó que ambos morfolinós eran capaces de reducir la expresión de EGFP (Fig. 28C-D'), hasta niveles en los que la fluorescencia resulta prácticamente indetectable en el 70% de los embriones inyectados, en comparación con los embriones control inyectados

con *EGFP* o con el morfolino control (Fig. 28A-B'). Asimismo, mediante *western blot* se observó una disminución de los niveles de EGFP en embriones analizados 24 horas después de la inyección (estadio 20, Fig. 28E).

Sin embargo, los morfolinicos contra Sox5 no provocaron ninguna alteración en las poblaciones de interneuronas a lo largo del eje D-V en el tubo neural. No se detectaron cambios en las poblaciones dl3 *Islet1*⁺, ni en las dl4-dl6 *Pax2*⁺ (Fig. 28H-I') en relación con los embriones inyectados con el morfolino control (Fig. 28F-G'). En conclusión, los morfolinicos específicos para Sox5 (Mo1 y Mo2) no producen ningún cambio claro sobre la diferenciación neural de la médula espinal de medaka. Esto podría ser debido a que los niveles de Sox5 endógenos no se reducen a niveles adecuados con el uso de estos morfolinicos. Dado que el anticuerpo policlonal disponible Sox5 no parece reconocer la proteína de medaka, no podemos saber si se está produciendo un bloqueo efectivo de la expresión de Sox5 en estos embriones. Por otra parte, no podemos descartar que Sox6a y Sox6b (los otros genes del grupo SoxD descritos en medaka) puedan compensar la falta de Sox5 en el contexto de la diferenciación neural.

8. Papel de Sox5 en la especificación del patrón ventral en el tubo neural

Puesto que Sox5 controla la generación del patrón dorsal y se expresa en los progenitores ventrales en el tubo neural, decidimos analizar si tiene también un papel en la especificación del patrón ventral. En experimentos preliminares, la expresión ectópica de Sox5 en el tubo neural de embriones de pollo provoca una expansión de la expresión de *Shh* hacia zonas dorsales a la placa del suelo (Fig. 29A), así como la expansión de la expresión de dianas directas de Shh, como *Vitronectina* y *FoxA2* (Fig. 29B,C).

En ratones transgénicos se han caracterizado dos regiones reguladoras en un fragmento de 1 Mb alrededor del gen de *Shh* que dirigen su expresión únicamente en la placa del suelo (Jeong *et al.*, 2006). Una de ellas está en el segundo intrón (*Shh* Floor Plate Enhancer 2, SFPE2; Epstein *et al.*, 1999) y su actividad está controlada por factores de transcripción FoxA2 y proteínas de tipo HD. La otra región reguladora (SFPE1) se encuentra en la región 5'UTR y, hasta ahora, no se han descrito los factores implicados en su activación (Epstein *et al.*, 1999). Mediante predicción informática hemos identificados dos posibles sitios de unión de factores Sox en SFPE1 y, al menos uno de ellos se encuentra conservado en pollo. Por ello, decidimos explorar la posibilidad de que Sox5 participe en la regulación y/o mantenimiento de la expresión de *Shh* en la placa del suelo a través de la unión de esos sitios en el SFPE1.

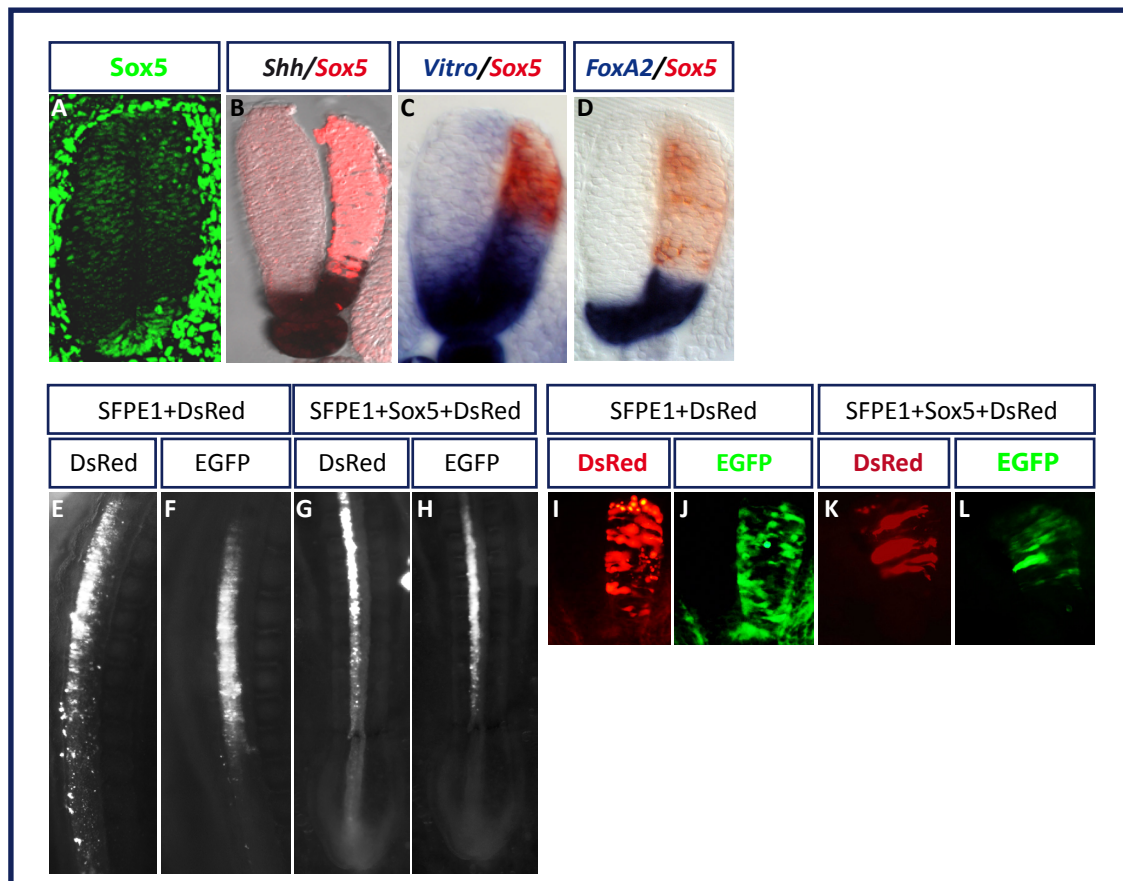


Fig. 29. Análisis de la actividad de la región reguladora SFPE1 de Shh en el tubo neural del embrión de pollo. (A) Análisis de la expresión de Sox5 mediante inmunohistoquímica en embriones de pollo de estadio HH15. Sox5 se expresa en los progenitores dorsales de la zona ventricular del tubo neural y en la placa del suelo, y en niveles bajos en los progenitores ventrales. (B-D) Embriones de pollo electroporados con Sox5-pCIG en estadio HH11 y analizados 24 PE en HH14-15 mediante hibridación *in situ* doble. En embriones con expresión ectópica de Sox5 se observa una expansión de la expresión de *Shh* (B) y sus dianas directas *Vitronectina* (C) y *FoxA2* (D) en el hemitubo electroporado en relación con el lado control sin electroporar. (E-L) Embriones de HH11 electroporados con SFPE1-ptkEGFP, DsRed o Sox5-pCAGGS y analizados 24 PE en HH14 mediante visualización de la fluorescencia. En los embriones que sobre-expresan SFPE1-ptkEGFP y DsRed, SFPE dirige el comienzo de la expresión de EGFP en zonas más rostrales (D) que el control de la electroporación con DsRed (E). La expresión ectópica de SFPE1-ptkEGFP+DsRed+Sox5-pCAGGS dirige el inicio de la expresión de EGFP hacia zonas más caudales (F) que la expresión del reportero DsRed (G). (H-K) Análisis de secciones de los embriones electroporados. En los embriones que sobre-expresan SFPE1-ptkEGFP y DsRed la expresión de EGFP y DsRed alcanza los mismos niveles en el eje D-V (H,I) al igual que ocurre en los embriones electroporados con SFPE1-ptkEGFP, Sox5 y DsRed (J,K).

Shh se expresa en la notocorda a lo largo de todo el eje A-P y en la placa del suelo, a niveles adyacentes a los somitas formados, en el embrión de ratón (Novitch *et al.*, 2003). Mediante PCR se clonó un fragmento de 1,2 Kpb (inmediatamente anterior al inicio de transcripción del gen de Shh), junto con un promotor mínimo del gen de la tirosín quinasa (tk) y la proteína reportera EGFP (SFPE1-ptkEGFP) en el vector pCAT3 (Uchikawa *et al.*, 2003). Como control de la electroporación se utilizó el plásmido pDsRed1-N1 (Clontech) que tiene un promotor y un enhancer de expresión ubicua, lo cual nos permite identificar la zona electroporada. Las construcciones se electroporaron en embriones de pollo de HH10 en zonas caudales del tubo neural posteriores a los últimos somitas.

En electroporaciones donde el reportero de la electroporación DsRed se expresa a niveles del tubo neural caudal, el enhancer SFPE1 (construcción SFPE1-ptkEGFP) dirigió la expresión del reportero EGFP a partir de regiones más rostrales a la expresión de DsRed (Fig. 29D,E). El mismo resultado se obtuvo cuando se electroporaron conjuntamente SFPE1-ptkEGFP y Sox5-pCIG (Fig. 29F-G).

Sin embargo, en secciones transversales de los embriones electroporados no se pudo observar ninguna restricción de la expresión del reportero EGFP en el eje D-V. Así, el enhancer SFPE1 no es capaz de dirigir en el embrión de pollo expresión localizada en la placa del suelo. Se observó que tanto los embriones electroporados con SFPE1-ptkEGFP y DsRed como aquellos en los que también se electroporó Sox5, la expresión de EGFP y DsRed alcanza los mismos niveles en el eje D-V (Fig. 29 H-K).

En conclusión, los datos anteriores pudieran sugerir que la región reguladora SFPE1 de Shh en pollo está implicada en el control temporal de la expresión de Shh a lo largo del eje A-P, dado que dirige el inicio de la expresión del reportero EGFP en regiones más rostrales que el control de la electroporación DsRed. Sin embargo, la región SFPE1 no parece mediar la regulación espacial de la expresión génica en el eje D-V. Ésto podría deberse a que esta región de 1 kpb puede contener sitios de unión para otros factores de transcripción que en pollo dirijan expresión ubicua en el eje D-V. Sería importante, además, titular la concentración del SFPE1-ptkEGFP en paralelo con la de otro promotor ya caracterizado, como TOP-RFP, para poder determinar si únicamente está reflejando actividad específica o ectópica. Por último, no se ha podido determinar la participación de Sox5 en el control de este fragmento puesto que su expresión ectópica no provocó ningún efecto. Sería conveniente realizar experimentos de falta de función de Sox5 para poder observar si la expresión de Shh en la placa del suelo encuentra afectada.

Discusión

Durante el desarrollo embrionario, el proceso de generación de poblaciones neuronales especializadas a partir de un grupo de progenitores multipotentes ha de estar finamente controlado en el espacio y en el tiempo. En el desarrollo de la médula espinal es de gran importancia entender cómo la adquisición de identidad por parte de poblaciones de progenitores e interneuronas es dependiente de la posición que éstas ocupan en el eje D-V. Además, el correcto balance entre la diferenciación y la proliferación de los progenitores neurales asegura el crecimiento del tubo neural y el mantenimiento del nicho de progenitores, permitiendo continuas rondas de diferenciación de neuronas y células de glía.

En este trabajo hemos demostrado que el factor de transcripción Sox5 está implicado en el control de la generación del patrón dorsal en la médula espinal y en la especificación del número correcto de interneuronas dorsales. Nuestros resultados revelan que el mecanismo molecular mediante el cual Sox5 regula este proceso es a través de la modulación de la vía de Wnt, ya que controla la activación transcripcional del represor de la ruta, Axina2. Mediante el aumento de los niveles de Axina2 en el tubo neural dorsal Sox5 restringe la extensión de la identidad dorsal impuesta por la vía de Wnt.

1. Sox5 está implicado en la regionalización dorsal del tubo neural

El estudio de la función de los genes Sox en diferentes procesos del desarrollo ha demostrado que Sox5 y Sox6 se coexpresan en muchos tejidos y que, por tanto, la pérdida de función de uno de ellos puede ser compensada, al menos parcialmente, por la actividad del otro (Smits *et al.*, 2001; Stolt *et al.*, 2006). En el contexto de la generación del patrón D-V en la médula espinal la expresión de Sox5 y Sox6 coincide en la zona ventricular del tubo neural en la que se encuentran los progenitores (Fig. 10, 11, 13; Stolt *et al.*, 2006), aunque la expresión es dinámica y varía a lo largo del desarrollo.

En la zona dorsal del tubo neural Sox5 se expresa en la placa del techo y en los progenitores desde el dominio dp3 y hacia zonas más ventrales (Martinez-Morales *et al.*, 2010). La expresión ectópica de Sox5 en la región más dorsal del tubo neural interfiere con la especificación de los progenitores de esa zona, ya que produce una disminución de las poblaciones dp1-dp2 (*Cath1*⁺ y *Ngn1*⁺; Fig. 14K,L). La expansión observada de las poblaciones dp3-dp5 (*Cash1*⁺) hacia regiones más dorsales de las que le corresponde (Fig. 14M) sugiere que Sox5 está implicado en el control de adquisición de identidad de estos progenitores. Además, en ausencia de Sox5 son precisamente los progenitores dp3-

dp5 (*Cash1*⁺) los que se encuentran disminuidos (Fig. 15M), mientras que la expresión de los marcadores de progenitores más dorsales se extiende hacia territorios ventrales (Fig. 15K,L). Por tanto, Sox5 es necesario para la especificación de los progenitores dp3 e interfiere con los progenitores dp1-dp2.

En los estudios realizados acerca de la implicación de las vías de señalización de Wnt y Bmp en la generación del patrón dorsal en la médula espinal las alteraciones producidas en las poblaciones de progenitores afectan a las interneuronas derivadas de ellos. Por ejemplo, en los ratones dobles mutantes de Wnt1 y Wnt3a se produce una disminución de los progenitores dp1-dp3 y del número de interneuronas dl1-dl3 que se generan a partir de ellos (Muroyama *et al.*, 2002). En nuestros experimentos de falta de función de Sox5 la disminución de los progenitores dp3-dp5 se corresponde con la reducción del número de interneuronas dl3 y dl4. Aunque no hemos observado cambios en dl5, tampoco hemos caracterizado si los progenitores *Cash1*⁺ afectados eran sólo dp3-dp4 o también incluían a los dp5.

En embriones con niveles reducidos de Sox5 hemos observado que el dominio de progenitores dp2 está expandido, mientras que el número de interneuronas dl2 se encuentra claramente reducido. Esto podría deberse a que Sox5 también participa en la salida de ciclo de los progenitores neurales (Martinez-Morales *et al.*, 2010) y, por tanto, la disminución del número de interneuronas dl2 podría deberse a un retraso más prolongado de la diferenciación de los progenitores dp2 que de los otros progenitores dorsales y ventrales. Aunque no se ha estudiado en gran detalle en la médula espinal, la diferenciación de las interneuronas sigue un cierto orden en el cual las interneuronas dl2 y las motoneuronas se diferencian antes que las demás poblaciones de interneuronas (nuestras observaciones; Caspary & Anderson, 2003; Hartenstein, 1993). Sin embargo, no está claro que el momento de salida de ciclo esté implicado en la adquisición de identidad de las diferentes poblaciones en el tubo neural como ocurre durante el desarrollo de la corteza. En el neocórtex de ratón Sox5 controla la generación secuencial de subtipos neuronales (Lai *et al.*, 2008). Nuestros resultados abren la posibilidad de que en el tubo neural Sox5 no sólo controle la especificación de los progenitores dorsales sino que también participe en la regulación del orden de diferenciación de las interneuronas.

En estudios previos del laboratorio, en los cuales se bloqueó la expresión de Sox5 en una ventana temprana (electroporación en HH11 y análisis 48h PE en HH18; ventana 1) se observó que el conjunto de poblaciones de interneuronas Lhx1/5⁺ (dl2, dl4 y dl6-v2) y las interneuronas Islet⁺ (dl3) se encontraban reducidas (Martinez-Morales *et al.*, 2010). La población más afectada fué la de las interneuronas dl3. En este trabajo hemos realizado un estudio más detallado de las distintas poblaciones. En los análisis realizados en embriones en los que los niveles de Sox5 se redujeron en una ventana

tardía (electroporación en HH14 y análisis 48h PE en HH24-25; ventana 2), una vez que se expresan casi todos los marcadores de progenitores, se produce una reducción diferencial del número de interneuronas, más reducidas las dl2 y dl3 y menos afectadas las dl1 y dl4. (Fig. 17). Además, la disminución del número de interneuronas, fundamentalmente las dl3, no es tan pronunciado como en la ventana 1, lo cual sugiere que el efecto de la falta de función de Sox5 en la diferenciación pueda ser transitorio, y que la población dl3 se recupere con el tiempo.

Además, en este proyecto hemos realizado un análisis de las poblaciones de interneuronas en una nueva ventana de desarrollo que comprende las ventanas 1 y 2 (electroporación en HH11 y análisis 72h PE en HH24-25; ventana 3). En estos casos se observa una disminución generalizada del número de interneuronas de todas las poblaciones analizadas (dl2-v0; Fig. 18). Si se impide la muerte celular, mediante la sobreexpresión de la proteína antiapoptótica Bcl2, se recupera el número de interneuronas de las poblaciones estudiadas e incluso se produce un incremento de la población dl3 (Fig. 19) poniendo así en evidencia la importancia de Sox5 en la supervivencia de las interneuronas dl3 que son Sox5⁺. Pero sobre todo, estos datos sugieren que Sox5 juega un papel fundamental en la supervivencia general de las interneuronas y/o progenitores dorsales en etapas tempranas, mientras que más tarde su función se ejerce de manera específica sobre ciertos subtipos de progenitores, afectando claramente a la especificación y supervivencia de los progenitores dorsales y provocando así la reducción en el número de interneuronas derivadas de los progenitores que permanecen.

En embriones con niveles elevados de Sox5 no es posible analizar defectos en la especificación de las interneuronas derivados de las alteraciones en los progenitores. Análisis realizados anteriormente en el laboratorio demuestran que estas células salen de ciclo e inician su diferenciación de forma prematura, pero son incapaces de completar el programa de diferenciación, de tal manera, que en la zona del manto se observa una disminución generalizada del número de interneuronas. Por tanto, esta pérdida de interneuronas dorsales no es rescatable con el bloqueo de la apoptosis utilizando la sobreexpresión de Bcl2 (Martinez-Morales *et al.*, 2010).

Hasta ahora existían pocas evidencias acerca del papel que juegan los genes Sox en la generación de patrones en el SNC. En la médula espinal es necesario que los progenitores neurales se diferencien correctamente en distintas poblaciones para que, posteriormente, se generen los números correctos de subtipos neuronales a lo largo del eje D-V. En el desarrollo de la corteza cerebral de ratón Sox5 y Sox6 se expresan en poblaciones excluyentes de progenitores en la zona ventricular (Azim *et al.*, 2009) mientras que en la médula Sox5 y Sox6 se coexpresan en los progenitores (Fig. 10,11,13).

Así en el neocórtex de embriones de ratón, Sox5 y Sox6 se expresan en regiones mutuamente excluyentes de progenitores ventrales (subpallium) y dorsales (pallium), respectivamente. La corteza de los ratones mutantes para Sox6 muestra una alteración en la identidad de los progenitores dorsales, ya que expresan de manera ectópica marcadores propios del subpallium como Mash1, Islet1 o Sox5, por lo que Sox6 sería necesario en la especificación dorsal de los progenitores de la corteza (Azim *et al.*, 2009).

No obstante, esos cambios en los progenitores neurales de los ratones mutantes para Sox6 no afectan a la especificación de las neuronas de proyección que derivan de ellos. La alteración en la identidad sólo se ha descrito en las poblaciones de interneuronas de los embriones mutantes para Sox6, que expresan también Sox6.

En la médula espinal nosotros hemos determinado que la reducción de Sox5 causa tanto una alteración de la identidad de los progenitores neurales como cambios en el número de interneuronas que derivan de ellos; especialmente de las interneuronas dl3-dl4. Aunque los mutantes de Sox5 no muestran alteraciones en la identidad de los progenitores neurales de la corteza, sí muestran una alteración en la especificación de los distintos tipos de neuronas corticofugales y en el control del momento de la diferenciación de los mismos (Lai *et al.*, 2008). Así, la falta de función de Sox5 en el neocórtex provoca la aparición prematura de marcadores de neuronas de proyección tardías, lo que podría indicar una alteración en el orden de salida de ciclo de los progenitores (Lai *et al.*, 2008). Es decir, se produce una diferenciación prematura muy similar a la que ya se había descrito en los ratones dobles mutantes de Sox5 y Sox6 durante el desarrollo de condrocitos y oligodendrocitos (Smits *et al.*, 2001; Stolt *et al.*, 2006). Además, Sox5 regula postmitóticamente la migración y la diferenciación posterior de las neuronas de proyección de la subplaca (Kwan *et al.*, 2008).

En cuanto a los genes que pueden estar regulados por los genes SoxD en el control de la regionalización, en los ratones mutantes para Sox6 se produce una expansión hacia territorios dorsales de la expresión tanto de Sox5 como de Mash1. En este contexto la expresión de Sox5 coincide con la de Mash1 en los mismos progenitores, al igual que ocurre en la médula espinal. Sin embargo, en contra de lo que ocurre en la médula espinal (Fig. 15), en la corteza no se ha observado una disminución de la expresión de Mash1 en los ratones mutantes de Sox5.

2. Sox5 interacciona con la vía de Wnt en la región dorsal del tubo neural

Los mecanismos que controlan la especificación celular de los progenitores neurales en la médula espinal han sido ampliamente estudiados. Esto ha permitido clasificar las interneuronas dorsales en dos tipos: clase A y clase B. Las interneuronas de clase A comprenden las poblaciones dl1-dl3 y dependen de la señalización procedente de la placa del techo (Wnt y BMP) para su especificación. Por otro lado, las poblaciones intermedias dl4-dl6 forman parte de las interneuronas de clase B, y son dependientes de otras señales, entre las que podría estar el AR, para su especificación (Helms & Johnson, 2003; Zhuang & Sockanathan, 2006). Dentro de las interneuronas de clase A se ha demostrado que la señalización de BMP es necesaria para el mantenimiento de la identidad de la placa del techo (Millen *et al.*, 2004) y para la especificación de las interneuronas dl1 y dl2 (Chesnutt *et al.*, 2004; Wine-Lee *et al.*, 2004).

Por otro lado, la vía canónica de Wnt también se encuentra activa en la zona más dorsal del tubo neural y es necesaria para la adquisición de la identidad de los progenitores dorsales a través del control de los genes *Math1* y *Ngn1*, y para la especificación de las

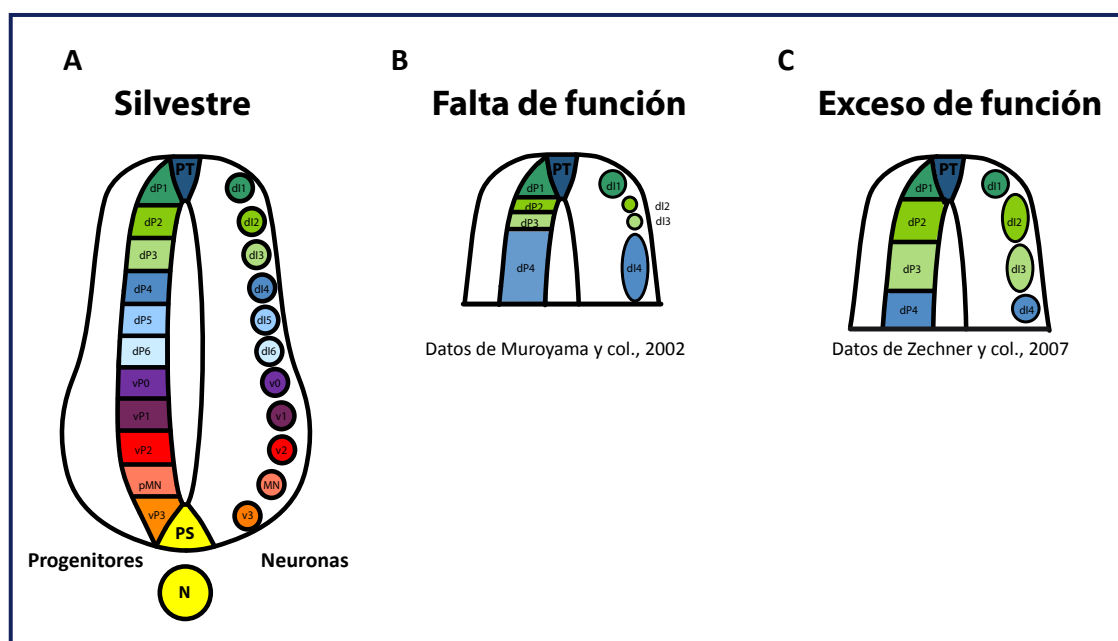


Fig. 30. Efectos de la falta y exceso de función de Wnt en el patrón dorsal. (A) Poblaciones de progenitores (zona ventricular) y neuronas (zona del manto) a lo largo del eje D-V en embriones silvestres. (B) En embriones mutantes para *Wnt1* y *Wnt3a* se produce una disminución de los dominios de progenitores dp2-dp3 a costa de una expansión de la población dp4. Se observa el mismo efecto en las poblaciones de interneuronas: disminución de dl2-dl3 e incremento de dl4. Datos procedentes de (Muroyama, et al, 2002). (C) En embriones con sobreexpresión de β -catenina en zona dorsal se observa un aumento de los progenitores e interneuronas 2 y 3 a costa de la reducción de los progenitores e interneuronas 4. Datos procedentes de (Zechner, et al, 2007). PT: placa del techo, PS: placa del suelo, N: notocorda.

poblaciones de interneuronas dl1-dl3 (Fig. 30; Hirabayashi *et al.*, 2004; Muroyama *et al.*, 2002). Además, el exceso de señalización de la vía de Wnt por expresión ectópica de β -catenina causa un incremento, bien de dl1 (Ille *et al.*, 2007) o bien de dl2 y dl3 (Zechner *et al.*, 2007), en función de la extensión de la sobre-expresión de β -catenina a lo largo del eje D-V. En ambos casos, el incremento del número de interneuronas más dorsales parece producirse a expensas de la disminución del número de interneuronas de las poblaciones adyacentes: dl2-dl3 o dl4-dl5, respectivamente (Fig. 30).

En este trabajo hemos observado que los cambios de identidad de los progenitores dp3-dp5 y la reducción de las interneuronas dl2-dl3 en embriones con bajos niveles de Sox5 (Fig. 15,17), son similares a los efectos descritos para los embriones con exceso de función de la vía de Wnt (Ille *et al.*, 2007; Muroyama *et al.*, 2002; Zechner *et al.*, 2007). Además, otros experimentos realizados en el laboratorio han demostrado que la actividad transcripcional de Wnt/ β -catenina, detectada mediante el uso de un reportero de TCF, está expandida ventralmente cuando la actividad de Sox5 está reducida (resultados no mostrados). Por ello, al menos en parte, la actividad de Sox5 sobre la identidad de los progenitores dorsales tiene lugar a través del control de la vía canónica de Wnt.

Sin embargo, no podemos descartar que Sox5 esté interfiriendo con la señalización de BMP al menos en el control de la identidad de la placa del techo y del número final de interneuronas dl1, ya que ambas poblaciones requieren señalización BMP para su especificación (Chesnutt *et al.*, 2004). Además, puesto que la actividad de Sox5 es también necesaria para la especificación de las interneuronas dl4 (Fig. 17) es probable que Sox5 también esté modulando las señales implicadas en la especificación de las poblaciones de interneuronas de clase B (dl4-dl6).

3. Mecanismos moleculares de interacción de Sox5 con la vía de Wnt

Existen numerosos procesos en los cuales los factores de transcripción Sox interaccionan con diferentes elementos de la vía de Wnt, especialmente con β -catenina, y regulan así la señalización de la ruta (Bernard & Harley, 2010; Wegner, 2010). En el caso de los miembros del grupo SoxD se ha descrito que la interacción directa de Sox13 con Tcf inhibe su actividad transcripcional durante el desarrollo de los linfocitos (Melichar *et al.*, 2007). Por otro lado, Sox6 ejerce su actividad de represión transcripcional mediante la interacción directa con β -catenina y el reclutamiento de HDCA1, lo cual, provoca la remodelación local de la cromatina y, en último término, la inhibición de la expresión de Ciclina D1 (Iguchi *et al.*, 2007). Un mecanismo similar se ha descrito para Sox5, que

también es capaz de interactuar con HDAC1 y CTBP2 e inhibir así la transcripción de Sox10 (Stolt *et al.*, 2008). Nuestros experimentos preliminares demuestran que tanto Sox5 como Sox6 interactúan con β -catenina (Fig. 21), aunque no sabemos si esto ocurre en el contexto de la región reguladora de *Axina2*, y que la expresión ectópica de Sox5 en el tubo neural de embriones de pollo provoca una disminución de β -catenina activa (Fig. 21). Es, por tanto posible que en el contexto de la regionalización del tubo neural Sox5 pueda unirse a β -catenina y reclute otras proteínas que actúen como correpresores o coactivadores para la modulación de la señalización de la vía de Wnt.

En este trabajo hemos demostrado también que Sox5 se une a trece sitios de unión conservados localizados en la región reguladora de *Axina2* (Fig. 22B), algunos de los cuales (T1-T8) son también sitios de unión de Tcf (Jho *et al.*, 2002). Resulta muy interesante que tres de los sitios a los cuales Sox5 se une con mayor actividad (T6, T7 y T8) se encuentren en el primer intrón de *Axina2*, puesto que se había demostrado que la falta de esta región produce una disminución de la transcripción de *Axina2* más drástica que la observada cuando se eliminan los sitios de promotor. Además, la unión de Sox5 a los sitios T6/T13 localizados en el primer intrón del gen de *Axina2* permite la activación transcripcional cooperativa de Sox5 y β -catenina/Tcf (Fig. 22F). Mediante el incremento de los niveles de *Axina2*, y puesto que actúa como un represor de la vía de Wnt (Lustig *et al.*, 2002; Qian *et al.*, 2011), Sox5 controlaría la represión de la vía de Wnt, restringiendo así su actividad únicamente a las regiones más dorsales del tubo neural (Fig. 31). Sin embargo, hasta ahora no existía ninguna evidencia de la regulación de un represor de la vía de Wnt mediada directamente por un factor Sox.

No obstante, el papel de Sox5 en la regionalización del tubo neural dorsal podría estar también mediado por el control transcripcional de otros factores de transcripción implicados en la especificación de la identidad de los progenitores dorsales. Este podría ser el caso de *Mash1*, que es necesario para la generación de las poblaciones de interneuronas dl3 y dl5 (Helms *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 1997). Se ha descrito la existencia de un *enhancer* de *Mash1* de 1 kpb que se encuentra a 7 kpb antes del inicio de la transcripción, y que dirige la expresión de *Mash1* al SNC (Verma-Kurvari *et al.*, 1998). En esta región hemos identificado tres sitios conservados de unión de genes Sox. En estudios preliminares de actividad luciferasa no hemos detectado activación transcripcional por parte de Sox5 en el promotor de *Mash1* (datos no mostrados). Sin embargo, en este promotor existen sitios de unión para otros factores de transcripción, entre los que se encuentran Gli, que se une al promotor y promueve la diferenciación neural (Voronova *et al.*, 2011), y *Msx1* y que, por tanto, podrían también estar participando en la especificación dorsal reprimiendo la expresión de *Mash1* en las zonas más dorsales en las cuales se expresa con mayor intensidad *Msx1*.

Como se ha visto anteriormente la vía de Wnt se encuentra implicada tanto en procesos de proliferación como en la regionalización del tubo neural dorsal. En ambos casos Sox5 participa en la regulación de la vía bien contrarrestando el efecto mitogénico de la vía de Wnt al promover la salida de ciclo de los progenitores (Martinez-Morales *et al.*, 2010) o restringiendo el dominio de actividad de la vía de Wnt en el eje D-V en el tubo neural. En este contexto la sobre-activación de la vía de Wnt mediante expresión ectópica de β -catenina produce cambios en los dominios de expresión de marcadores dorsales como *Msx1* o *Ngn1* y, por tanto, en la identidad de los progenitores (Ille *et al.*, 2007; Muroyama *et al.*, 2002; Zechner *et al.*, 2007). En nuestros experimentos preliminares de electroporación generalizada en todo el tubo neural de la forma constitutivamente activa de β -catenina hemos observado que provoca una disminución de la expresión de *Cath1* y *Cash1*. Además, en este contexto de sobre-activación masiva de la vía de Wnt, Sox5 no es capaz de contrarrestar la actividad de β -catenina y provocar el aumento de la expresión de *Cash1*; al contrario de lo que se ha descrito para otras dianas de la vía como *Ciclina D1* o *N-Myc* (Martinez-Morales *et al.*, 2010). Probablemente ésto se deba a que sea dependiente de la relación de las concentraciones de β -catenina y Sox5 o del mecanismo molecular por el que Sox5 actúe en el contexto de otros promotores distintos de Axina2.

En conclusión, Sox5 participa en la coordinación de los procesos de proliferación celular y en la regionalización del tubo neural mediante la modulación de la vía de Wnt, lo que permitirá generar neuronas dorsales especializadas y funcionales en la médula espinal (Fig. 31).

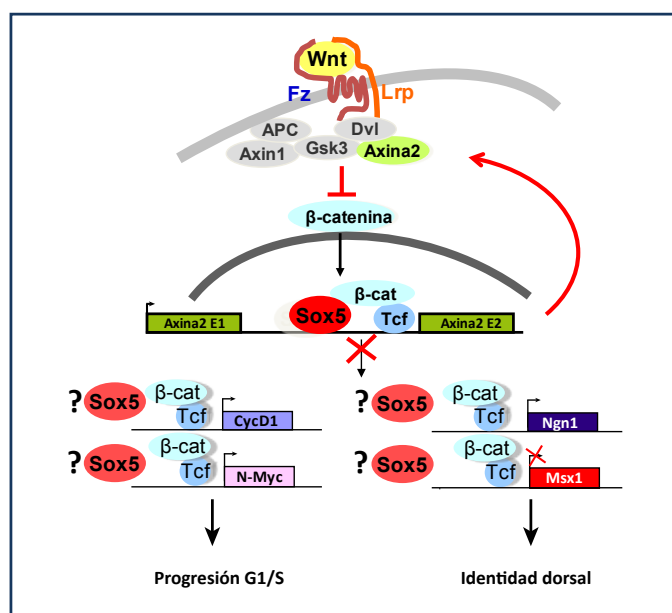


Fig. 31. Esquema de la interacción de Sox5 con la vía de Wnt en el tubo neural. Sox5 participa en la salida de ciclo de los progenitores de la médula espinal y en la especificación del patrón dorsal mediante la activación de la transcripción del regulador negativo Axina2.

4. La forma mutante Sox5^{M569I} actúa como dominante negativo

Una de las herramientas de bloqueo de función más extendidas es el uso de formas dominantes negativas; es decir, proteínas modificadas que impiden que la forma silvestre lleve a cabo su función. En el caso de los factores Sox se han utilizado fundamentalmente dos aproximaciones para la generación de formas dominantes negativas: construcciones en las cuales se elimina el dominio HMG o formas de las proteínas fusionadas con el dominio de represión de Engrailed. En el primer caso al carecer de caja HMG, las proteínas son incapaces de unirse al ADN pero no de interaccionar con otros Sox o con cofactores (Kishi *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2013). Por otro lado, las proteínas de fusión con el dominio de represión de Engrailed constituyen formas de la proteína con una fuerte actividad represora de sus genes diana, y se han utilizado fundamentalmente en el caso de los Sox que tienen dominios de transactivación (Graham *et al.*, 2003; Savage *et al.*, 2009). Estos dos tipos de dominantes negativos han sido descritos en diversos genes Sox en *Drosophila*, pollo, pez cebra y *Xenopus* (Graham *et al.*, 2003; Okuda *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2013).

En este trabajo hemos caracterizado un mutante de la proteína Sox5 larga de pollo (Sox5^{M569I}) que contiene una mutación puntual en el dominio HMG equivalente a la que se había descrito en Sry y que provoca reversión sexual en humanos (Murphy *et al.*, 2001). Hemos demostrado que esta forma de la proteína presenta muy poca afinidad de unión al ADN pero mantiene el resto de los dominios funcionales. Por todo ello puede funcionar de igual forma que la forma dominante negativa de Dichaete (ortólogo de Sox2 en *Drosophila*) que carece de la caja HMG y no se puede unir al ADN pero secuestra cofactores esenciales para su actividad transcripcional (Shen *et al.*, 2013). La expresión de Sox5^{M569I} provoca un fenotipo muy semejante al descrito para el bloqueo de función de Sox5 mediante el uso de ARNi, impide la diferenciación de las interneuronas y la actividad cooperativa con β -catenina en la activación transcripcional de *Axina2*. La capacidad de unión de Sox5 a otras proteínas como β -catenina, Sox5 o Sox6 para la formación de homo o heterodímeros, no debería estar alterada puesto que se mantiene los dominios de interacción *coiled-coil*. Sin embargo, tendríamos que analizar si Sox5^{M569I} es capaz de unirse a β -catenina tal y como habíamos descrito para la proteína silvestre.

5. Papel de Sox5 en la generación del patrón ventral de la médula espinal

En la zona ventral del tubo neural la regionalización se produce gracias a la actividad de Shh secretado por la placa del suelo y la notocorda subyacente (Jessell, 2000; Ribes & Briscoe, 2009; Ulloa & Briscoe, 2007). Al igual que en el caso de la señalización de Wnt en el tubo neural dorsal, en la región ventral la señalización de Shh participa tanto en el control de la proliferación y salida de ciclo de los progenitores (Megason & McMahon, 2002; Ulloa & Briscoe, 2007) como en la diferenciación de las interneuronas ventrales y las motoneuronas (Dessaud *et al.*, 2008; Ribes & Briscoe, 2009). En este trabajo hemos demostrado que en la zona dorsal del tubo neural Sox5 participa en la coordinación de ambos procesos a través de la modulación de la vía de Wnt y, es probable, que en la región ventral del tubo esté participando también en la regulación de estos procesos a través de la modulación de la expresión de Shh, puesto que tanto su expresión como la de algunas de sus dianas se encuentra extendida en embriones que expresan altos niveles de Sox5. Sin embargo, en este caso la inducción de Shh por parte de Sox5 provocaría un incremento de la proliferación del tubo neural ventral de forma opuesta a lo que se ha descrito en la región dorsal y sobre lo que no tenemos ninguna evidencia (Martínez-Morales *et al.*, 2010).

En una región reguladora de 1 Mpb alrededor del gen de Shh se ha identificado la existencia de dos regiones conservadas que dirigen la expresión de Shh a la zona ventral del tubo neural (Epstein *et al.*, 1999; Jeong *et al.*, 2006). Nuestros experimentos preliminares demuestran que la región reguladora SFPE1 puede estar implicada en el control temporal de la expresión de Shh puesto que provoca que la expresión reportera se inicie en zonas más rostrales que las correspondientes con la electroporación de un reportero regulado de forma ubicua. En estos análisis no hemos podido determinar que Sox5 esté participando en la regulación de la expresión de Shh en la placa del suelo. Sin embargo, habría que continuar con los análisis utilizando fragmentos más pequeños de la región reguladora, puesto que la utilizada de 1 Kpb puede contener sitios de unión para otros factores de transcripción. En el estudio de la otra región que dirige expresión hacia la línea media (SFPE2) se ha descrito que es sólo un fragmento de 88 pb el que presenta dos sitios de unión, de activación y represión, que controlan la expresión en la placa del suelo (Jeong & Epstein, 2003). Resulta importante también señalar que los módulos reguladores equivalentes en diferentes especies no siempre pueden identificarse mediante homología de las secuencias, como se ha descrito en el caso de Sox2 en embriones de pollo y ratón (Uchikawa *et al.*, 2003).

Sería también importante titular la construcción, electroporándola a diferentes concentraciones en comparación con otras que ya tengamos en uso. Una vez que se

tenga, deberíamos analizar si la expresión de Shh, sus dianas o los marcadores de poblaciones de progenitores ventrales se encuentran alterados en estos embriones. Es asimismo esencial determinar si Sox5 es realmente capaz de unirse a estos sitios.

6. Generación del patrón D-V en embriones de pez medaka

La generación del patrón D-V en teleósteos se ha estudiado fundamentalmente en embriones de pez cebra y presenta bastantes similitudes con la de ratón y pollo en cuanto a las vías de señalización implicadas. Así, en embriones de pez cebra se ha descrito la implicación de las vías de BMP y Wnt en los procesos de dorsalización de la placa neural y de la médula espinal (Appel, 2000; Bonner *et al.*, 2008; Langdon & Mullins, 2011). De la misma manera, se ha estudiado aún en mayor detalle el papel de la vía de señalización de Shh en la generación del patrón ventral, así como su implicación en la especificación de diferentes poblaciones de progenitores, neuronas y oligodendrocitos que expresan los mismos factores de transcripción (como Olig2, Nkx2.2 o Nkx6.1) que se han descrito en embriones de pollo y ratón (Guner & Karlstrom, 2007; Park *et al.*, 2004; Strähle *et al.*, 2004).

Hasta ahora no se había estudiado la regionalización D-V del tubo neural en embriones de pez medaka. Para poder determinar si la función de Sox5 en la generación del patrón dorsal se encuentra conservada a lo largo de la evolución, en primer lugar caracterizamos la expresión de los factores de transcripción que se expresan en las diferentes poblaciones en embriones de medaka. De los marcadores de poblaciones de progenitores sólo se ha descrito la expresión de Olig2 a lo largo del eje D-V (Assouline *et al.*, 2002) mientras que de otros, como Olig2, Olig3 o Pax6, se ha observado su expresión en el tubo neural a lo largo del eje A-P (Klüver *et al.*, 2005; Lopez-Rios *et al.*, 2008; Ruiz *et al.*, 2009) o en la notocorda (Yokoi *et al.*, 2002) pero sin determinar los niveles D-V. En otros teleósteos como pez cebra, se ha caracterizado, entre otros, la expresión de DrPax6 en el cerebro (Wullimann & Rink, 2002), o en la médula espinal, así como DrNkx6.1, DrPax3, DrPax6, DrPax7, DrNkx2.2 (Cheesman *et al.*, 2004; Gribble *et al.*, 2007; Guner & Karlstrom, 2007; Kuscha *et al.*, 2012; Reimer *et al.*, 2009). En este trabajo hemos caracterizado la expresión de Olig2, Olig3, Olig4 y Olig5 en el eje D-V del tubo neural de embriones de pez medaka.

Además, en medaka tampoco se había descrito todavía la expresión de marcadores de neuronas en el tubo neural, aunque en pez cebra sí que se habían caracterizado algunos como DrPax2, DrIsl1 o DrHuC/D tanto en el embrión completo como en el

eje D-V (Gribble *et al.*, 2009; Kuscha *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2004; Pfeffer *et al.*, 1998) entre otros. Asimismo, en este organismo se había observado la expresión de Ap2 en las CCN (Knight *et al.*, 2005; Van Otterloo *et al.*, 2012). Nosotros hemos caracterizado la expresión de *Olhx5*, *OlPax2*, *OlIselt*, *OlEn2*, *OlAp2* y *OlHuC/D* en embriones de pez medaka, así como del marcador de proliferación PH3 en el tubo neural.

El análisis de la expresión de los diferentes marcadores de progenitores e interneuronas en pez medaka nos ha permitido observar que su patrón de expresión es muy similar al que se había descrito en embriones de pollo y ratón. Sin embargo, resulta difícil determinar exactamente en qué poblaciones se expresa cada uno de los factores de transcripción debido a que sólo algunos de los anticuerpos comerciales disponibles reconocen las proteínas de medaka. Además, se trata de un tejido muy compacto en el cual es difícil diferenciar la zona ventricular de la del manto, y en el que parece que el número de células de cada tipo es mucho menor que en los embriones de pollo. Es importante también tener en cuenta que el genoma de los teleósteos ha sufrido un proceso de duplicación (Vandepoele *et al.*, 2004) por lo que algunos de los genes implicados en la regionalización del tubo ventral como Pax6, Nkx2.2 o Dbx1 presentan dos copias en pez cebra (Guner & Karlstrom, 2007). La existencia de dos copias supone que estas proteínas pueden tener funciones redundantes o que sólo una de las copias juegue un papel importante en la generación del patrón. En el caso de este trabajo, el hecho de que no se hayan observado alteraciones en el patrón D-V en los embriones inyectados con los morfolinós de Sox5 puede deberse a que no se bloquee correctamente la expresión de Sox5 y que sea necesario diseñar unos nuevos, o a que la falta de función se vea compensada por la actividad de alguna de las dos copias de Sox6 que se han descrito en medaka.

La importancia de Sox5 en la adquisición de la identidad de las interneuronas dorsales queda también patente en la superproducción de interneuronas dI3 en embriones de pez medaka con exceso de función de Sox5 (Fig. 27). Sin embargo, en embriones de pollo no se puede determinar si se produce el mismo efecto, porque Sox5 está implicado en supervivencia y en los embriones con exceso de función de Sox5 se observa una disminución generalizada de las interneuronas (Martinez-Morales *et al.*, 2010). En medaka no parece haber defectos globales en la diferenciación de las interneuronas y, por tanto, no parece que Sox5 provoque una salida prematura de ciclo en los progenitores. Tal vez esa función recaiga en alguno de los dos genes de Sox6 de medaka (*OlSox6a* y *OlSox6b*; Cui *et al.*, 2011), cuyo análisis no se ha abordado en esta tesis.

En conjunto, en esta tesis hemos demostrado que Sox5 está implicado en la regionalización del tubo neural dorsal mediante la regulación de la extensión de la actividad de la vía de Wnt. Este es el primer estudio en el que se ha identificado la implicación de un gen Sox en la generación del patrón D-V en la médula espinal y el primero que describe la participación de Sox5 en la generación de patrones. Para ello, actúa junto con β -catenina en la activación transcripcional del regulador negativo de la ruta Axina2. Además, participa en el control del número de interneuronas dorsales ya sea regulando supervivencia y/o especificación de subtipo. Es probable que en este contexto esté actuando de forma concertada con Sox6 por lo cual habría que explorar la actividad de este factor de transcripción en la generación del patrón dorsal.

La correcta regionalización del tubo neural es de gran importancia, puesto que en la médula espinal adulta las regiones dorsales y ventrales darán lugar a neuronas diferentes con funciones concretas. Antes de que sean completamente funcionales estas neuronas tienen que migrar hasta alcanzar su posición específica en la médula. Así por ejemplo, en la zona dorsal las interneuronas dl1-dl3 migran hacia regiones más ventrales mientras que las dl4-dl5 migran lateralmente (Gross *et al.*, 2002). Sería interesante determinar si en este proceso de especificación de los distintos tipos de interneuronas y de su migración en la médula espinal se encontrara implicado Sox5 tal y como ya se ha demostrado durante el desarrollo de la corteza (Kwan *et al.*, 2008; Lai *et al.*, 2008).

La zona dorsal de la médula espinal constituye la primera estación en la que recalcan las neuronas somatosensoriales encargadas recibir los estímulos, tanto externos como internos del organismo (Helms & Johnson, 2003). Entre las señales que se procesan en la zona dorsal se encuentran las del dolor, el calor o el tacto (Julius & Basbaum, 2001). Es, por tanto importante la especificación de los distintos tipos de interneuronas en posiciones concretas, un proceso que parece estar modulado, al menos en parte, por Sox5. Las poblaciones de interneuronas que se encuentran afectadas en mayor medida en los embriones con bajos niveles de Sox5 (dl1-dl3) constituyen neuronas de proyección dorsales, excitatorias glutamatérgicas (Cheng *et al.*, 2004) que transmiten la información a otros centros de procesamiento superior como el tálamo, el cerebelo o el mesencéfalo, o incluso pueden conectar con motoneuronas (dl3), entre otros (Gross *et al.*, 2002; Müller *et al.*, 2002). En conclusión, las interneuronas más dorsales del tubo neural están implicadas en circuitos esenciales por lo que resulta muy relevante que se especifiquen en un número correcto y en la posición adecuada, un proceso en el que participa Sox5, para que la médula adulta sea funcional.

Conclusions

1. Sox5 genes expression is regionalized in the developing neural tube. Sox5 expression is conserved in chicken, mouse and medaka fish embryos and Sox6 expression is conserved in chicken and mouse embryos
2. Regionalized expression of Sox5 is required for the maintenance of roof plate identity and for the specification of dorsal progenitors from the dp3-dp5 domains in chicken embryos.
3. Ectopically expressed Sox5 interferes with dp1 and dp2 progenitor identity in the chicken neural tube.
4. Sox5 controls the specification and/or survival of dorsal interneurons,.
5. The defects in dorsal specification in embryos with reduced levels of Sox5 are similar to the effects of excessive canonical Wnt signaling.
6. Sox5 is required for *Axin2* transcription in dorsal progenitors.
7. Sox5 regulates dorsal patterning through binding to a conserved *Axin2* enhancer region.
8. Sox5 cooperates with Tcf/ β -catenin in the transcriptional activation of *Axin2*.
9. Sox5 controls the feedback repressor pathway of Wnt signaling, by increasing *Axin2* levels, thus restricting the extension of dorsal identity imposed by the Wnt pathway in the spinal cord.

Bibliografía

- Akiyama, H., Lyons, J. P., Mori-Akiyama, Y., Yang, X., Zhang, R., Zhang, Z., Deng, J. M., Taketo, M. M., Nakamura, T., Behringer, R. R., McCrea, P. D. and de Crombrughe, B.** (2004) Interactions between Sox9 and β -catenin control chondrocyte differentiation. *Genes & development*, **18**, 1072-1087.
- Alaynick, W. A., Jessell, T. M. and Pfaff, S. L.** (2011) SnapShot: Spinal Cord Development. *Cell*, **146**, 178-178.e171.
- Alvarez-Medina, R., Cayuso, J., Okubo, T., Takada, S. and Martí, E.** (2008) Wnt canonical pathway restricts graded Shh/Gli patterning activity through the regulation of Gli3 expression. *Development*, **135**, 237-247.
- Appel, B.** (2000) Zebrafish neural induction and patterning. *Developmental Dynamics*, **219**, 155-168.
- Assouline, B., Nguyen, V., Mahé, S., Bourrat, F. and Scharfmann, R.** (2002) Development of the pancreas in medaka. *Mechanisms of Development*, **117**, 299-303.
- Azim, E., Jabaudon, D., Fame, R. M. and Macklis, J. D.** (2009) SOX6 controls dorsal progenitor identity and interneuron diversity during neocortical development. *Nat Neurosci*, **12**, 1238-1247.
- Bergsland, M., Ramsköld, D., Zaouter, C., Klum, S., Sandberg, R. and Muhr, J.** (2011) Sequentially acting Sox transcription factors in neural lineage development. *Genes & development*, **25**, 2453-2464.
- Bernard, P. and Harley, V. R.** (2010) Acquisition of SOX transcription factor specificity through protein-protein interaction, modulation of Wnt signalling and post-translational modification. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **42**, 400-410.
- Bonner, J., Gribble, S. L., Veien, E. S., Nikolaus, O. B., Weidinger, G. and Dorsky, R. I.** (2008) Proliferation and patterning are mediated independently in the dorsal spinal cord downstream of canonical Wnt signaling. *Developmental Biology*, **313**, 398-407.
- Bovolenta, P., Esteve, P., Ruiz, J., Cisneros, E. and Lopez-Rios, J.** (2008) Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. *J Cell Sci*, **121**, 737 - 746.
- Bowles, J., Schepers, G. and Koopman, P.** (2000) Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Developmental Biology*, **227**, 239-255.
- Briscoe, J. and Ericson, J.** (2001) Specification of neuronal fates in the ventral neural tube. *Current Opinion in Neurobiology*, **11**, 43-49.
- Briscoe, J., Pierani, A., Jessell, T. M. and Ericson, J.** (2000) A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell*, **101**, 435-445.
- Bylund, M., Andersson, E., Novitch, B. G. and Muhr, J.** (2003) Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity. *Nat Neurosci*, **6**, 1162-1168.

- Caspary, T. and Anderson, K. V.** (2003) Patterning cell types in the dorsal spinal cord: what the mouse mutants say. *Nature Reviews Neuroscience*, **4**, 289-297.
- Cauthen, C. A., Berdugo, E., Sandler, J. and Burrus, L. W.** (2001) Comparative analysis of the expression patterns of Wnts and Frizzleds during early myogenesis in chick embryos. *Mechanisms of Development*, **104**, 133-138.
- Cayuso, J., Ulloa, F., Cox, B., Briscoe, J. and Martí, E.** (2006) The Sonic hedgehog pathway independently controls the patterning, proliferation and survival of neuroepithelial cells by regulating Gli activity. *Development*, **133**, 517-528.
- Clevers, H. and Nusse, R.** (2012) Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell*, **149**, 1192-1205.
- Cui, J., Shen, X., Zhao, H. and Nagahama, Y.** (2011) Genome-wide analysis of Sox genes in medaka (*Oryzias latipes*) and their expression pattern in embryonic development. *Cytogenetic and Genome Research*, **134**, 283-294.
- Cheesman, S. E., Layden, M. J., Von Ohlen, T., Doe, C. Q. and Eisen, J. S.** (2004) Zebrafish and fly Nkx6 proteins have similar CNS expression patterns and regulate motoneuron formation. *Development*, **131**, 5221-5232.
- Cheng, L., Arata, A., Mizuguchi, R., Qian, Y., Karunaratne, A., Gray, P. A., Arata, S., Shirasawa, S., Bouchard, M. and Luo, P.** (2004) Tlx3 and Tlx1 are post-mitotic selector genes determining glutamatergic over GABAergic cell fates. *Nature Neuroscience*, **7**, 510-517.
- Chesnutt, C., Burrus, L. W., Brown, A. M. C. and Niswander, L.** (2004) Coordinate regulation of neural tube patterning and proliferation by TGF β and WNT activity. *Developmental Biology*, **274**, 334-347.
- Cheung, M., Chaboissier, M. C., Mynett, A., Hirst, E., Schedl, A. and Briscoe, J.** (2005) The transcriptional control of trunk neural crest induction, survival, and delamination. *Developmental cell*, **8**, 179-192.
- Das, R. M., Van Hateren, N. J., Howell, G. R., Farrell, E. R., Bangs, F. K., Porteous, V. C., Manning, E. M., McGrew, M. J., Ohyama, K., Sacco, M. A., Halley, P. A., Sang, H. M., Storey, K. G., Placzek, M., Tickle, C., Nair, V. K. and Wilson, S. A.** (2006) A robust system for RNA interference in the chicken using a modified microRNA operon. *Developmental Biology*, **294**, 554-563.
- Denny, P., Swift, S., Connor, F. and Ashworth, A.** (1992) An SRY-related gene expressed during spermatogenesis in the mouse encodes a sequence-specific DNA-binding protein. *The EMBO journal*, **11**, 3705.
- Dessaud, E., McMahon, A. P. and Briscoe, J.** (2008) Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network. *Development*, **135**, 2489-2503.
- Dessaud, E., Ribes, V., Balaskas, N., Yang, L. L., Pierani, A., Kicheva, A., Novitsch, B. G., Briscoe, J. and Sasai, N.** (2010) Dynamic assignment and maintenance of positional identity in the ventral neural tube by the morphogen Sonic Hedgehog. *PLoS Biology*, **8**, e1000382.

- Dessaud, E., Yang, L. L., Hill, K., Cox, B., Ulloa, F., Ribeiro, A., Mynett, A., Novitch, B. G. and Briscoe, J. (2007) Interpretation of the sonic hedgehog morphogen gradient by a temporal adaptation mechanism. *Nature*, **450**, 717-720.
- Diez del Corral, R., Olivera-Martinez, I., Goriely, A., Gale, E., Maden, M. and Storey, K. (2003) Opposing FGF and retinoid pathways control ventral neural pattern, neuronal differentiation, and segmentation during body axis extension. *Neuron*, **40**, 65-79.
- Diez del Corral, R. and Storey, K. G. (2004) Opposing FGF and retinoid pathways: a signalling switch that controls differentiation and patterning onset in the extending vertebrate body axis. *BioEssays*, **26**, 857-869.
- Duman-Scheel, M., Weng, L., Xin, S. and Du, W. (2002) Hedgehog regulates cell growth and proliferation by inducing Cyclin D and Cyclin E. *Nature*, **417**, 299-304.
- Epstein, D. J., McMahon, A. P. and Joyner, A. L. (1999) Regionalization of Sonic hedgehog transcription along the anteroposterior axis of the mouse central nervous system is regulated by Hnf3-dependent and -independent mechanisms. *Development*, **126**, 281-292.
- Fujita, S. (1964) Analysis of neuron differentiation in the central nervous system by tritiated thymidine autoradiography. *The Journal of comparative neurology*, **122**, 311-327.
- Girard, M. and Goossens, M. (2006) Sumoylation of the SOX10 transcription factor regulates its transcriptional activity. *FEBS Letters*, **580**, 1635-1641.
- Graham, V., Khudyakov, J., Ellis, P. and Pevny, L. (2003) SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron*, **39**, 749-765.
- Gribble, S. L., Kim, H.-S., Bonner, J., Wang, X. and Dorsky, R. I. (2009) Tcf3 inhibits spinal cord neurogenesis by regulating sox4a expression. *Development*, **136**, 781-789.
- Gribble, S. L., Nikolaus, O. B. and Dorsky, R. I. (2007) Regulation and function of Dbx genes in the zebrafish spinal cord. *Developmental Dynamics*, **236**, 3472-3483.
- Gross, M. K., Dottori, M. and Goulding, M. (2002) Lbx1 specifies somatosensory association interneurons in the dorsal spinal cord. *Neuron*, **34**, 535-549.
- Gubbay, J., Collignon, J., Koopman, P., Capel, B., Economou, A., Munsterberg, A., Vivian, N., Goodfellow, P. and Lovell-Badge, R. (1990) A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature*, **346**, 245-250.
- Guner, B. and Karlstrom, R. O. (2007) Cloning of zebrafish nkx6. 2 and a comprehensive analysis of the conserved transcriptional response to Hedgehog/Gli signaling in the zebrafish neural tube. *Gene Expression Patterns*, **7**, 596-605.
- Hamburger, V. and Hamilton, H. L. (1951) A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology*, **88**, 49-92.

- Han, Y. and Lefebvre, V.** (2008) L-Sox5 and Sox6 drive expression of the aggrecan gene in cartilage by securing binding of Sox9 to a far-upstream enhancer. *Molecular and Cellular Biology*, **28**, 4999-5013.
- Hartenstein, V.** (1993) Early pattern of neuronal differentiation in the *Xenopus* embryonic brainstem and spinal cord. *The Journal of comparative neurology*, **328**, 213-231.
- Hattori, T., Coustry, F., Stephens, S., Eberspaecher, H., Takigawa, M., Yasuda, H. and de Crombrughe, B.** (2008) Transcriptional regulation of chondrogenesis by coactivator Tip60 via chromatin association with Sox9 and Sox5. *Nucleic Acids Research*, **36**, 3011-3024.
- He, T.-C., Sparks, A. B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L. T., Morin, P. J., Vogelstein, B. and Kinzler, K. W.** (1998) Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*, **281**, 1509-1512.
- Helms, A. W., Battiste, J., Henke, R. M., Nakada, Y., Simplicio, N., Guillemot, F. and Johnson, J. E.** (2005) Sequential roles for Mash1 and Ngn2 in the generation of dorsal spinal cord interneurons. *Development*, **132**, 2709-2719.
- Helms, A. W. and Johnson, J. E.** (2003) Specification of dorsal spinal cord interneurons. *Current Opinion in Neurobiology*, **13**, 42-49.
- Hirabayashi, Y., Itoh, Y., Tabata, H., Nakajima, K., Akiyama, T., Masuyama, N. and Gotoh, Y.** (2004) The Wnt/ β -catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells. *Development*, **131**, 2791-2801.
- Huang, W., Zhou, X., Lefebvre, V. and de Crombrughe, B.** (2000) Phosphorylation of SOX9 by cyclic AMP-dependent protein kinase A enhances SOX9's ability to transactivate aCol2a1 chondrocyte-specific enhancer. *Molecular and Cellular Biology*, **20**, 4149-4158.
- Iguchi, H., Urashima, Y., Inagaki, Y., Ikeda, Y., Okamura, M., Tanaka, T., Uchida, A., Yamamoto, T. T., Kodama, T. and Sakai, J.** (2007) SOX6 suppresses cyclin D1 promoter activity by interacting with β -catenin and histone deacetylase 1, and its down-regulation induces pancreatic β -cell proliferation. *Journal of Biological Chemistry*, **282**, 19052-19061.
- Ille, F., Atanasoski, S., Falk, S., Ittner, L. M., Märki, D., Büchmann-Møller, S., Wurdak, H., Suter, U., Taketo, M. M. and Sommer, L.** (2007) Wnt/BMP signal integration regulates the balance between proliferation and differentiation of neuroepithelial cells in the dorsal spinal cord. *Developmental Biology*, **304**, 394-408.
- Iwamatsu, T.** (2004) Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*. *Mechanisms of Development*, **121**, 605-618.
- Jamieson, C., Sharma, M. and Henderson, B. R.** (2012) Wnt signaling from membrane to nucleus: β -Catenin caught in a loop. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*.
- Jeong, Y., El-Jaick, K., Roessler, E., Muenke, M. and Epstein, D. J.** (2006) A functional screen for sonic hedgehog regulatory elements across a 1 Mb interval identifies long-range ventral forebrain enhancers. *Development*, **133**, 761-772.

- Jeong, Y. and Epstein, D. J.** (2003) Distinct regulators of Shh transcription in the floor plate and notochord indicate separate origins for these tissues in the mouse node. *Development*, **130**, 3891-3902.
- Jessell, T. M.** (2000) Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet*, **1**, 20-29.
- Jho, E.-h., Zhang, T., Domon, C., Joo, C.-K., Freund, J.-N. and Costantini, F.** (2002) Wnt/ β -Catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Molecular and Cellular Biology*, **22**, 1172-1183.
- Julius, D. and Basbaum, A. I.** (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, **413**, 203-210.
- Kenney, A. M., Cole, M. D. and Rowitch, D. H.** (2003) Nmyc upregulation by sonic hedgehog signaling promotes proliferation in developing cerebellar granule neuron precursors. *Development*, **130**, 15-28.
- Kenney, A. M. and Rowitch, D. H.** (2000) Sonic hedgehog promotes G1 Cyclin expression and sustained cell cycle progression in mammalian neuronal precursors. *Molecular and Cellular Biology*, **20**, 9055-9067.
- Kishi, M., Mizuseki, K., Sasai, N., Yamazaki, H., Shiota, K., Nakanishi, S. and Sasai, Y.** (2000) Requirement of Sox2-mediated signaling for differentiation of early *Xenopus* neuroectoderm. *Development*, **127**, 791-800.
- Klüver, N., Kondo, M., Herpin, A., Mitani, H. and Schartl, M.** (2005) Divergent expression patterns of Sox9 duplicates in teleosts indicate a lineage specific subfunctionalization. *Development genes and evolution*, **215**, 297-305.
- Knight, R. D., Javidan, Y., Zhang, T., Nelson, S. and Schilling, T. F.** (2005) AP2-dependent signals from the ectoderm regulate craniofacial development in the zebrafish embryo. *Development*, **132**, 3127-3138.
- Kondoh, H. and Kamachi, Y.** (2010) SOX-partner code for cell specification: Regulatory target selection and underlying molecular mechanisms. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **42**, 391-399.
- Koopman, P., Schepers, G., Brenner, S. and Venkatesh, B.** (2004) Origin and diversity of the Sox transcription factor gene family: genome-wide analysis in *Fugu rubripes*. *Gene*, **328**, 177-186.
- Kuscha, V., Frazer, S. L., Dias, T. B., Hibi, M., Becker, T. and Becker, C. G.** (2012) Lesion-induced generation of interneuron cell types in specific dorsoventral domains in the spinal cord of adult zebrafish. *The Journal of comparative neurology*, **520**, 3604-3616.
- Kuwabara, T., Hsieh, J., Muotri, A., Yeo, G., Warashina, M., Lie, D. C., Moore, L., Nakashima, K., Asashima, M. and Gage, F. H.** (2009) Wnt-mediated activation of NeuroD1 and retro-elements during adult neurogenesis. *Nature Neuroscience*, **12**, 1097-1105.

- Kuwahara, A., Hirabayashi, Y., Knoepfler, P. S., Taketo, M. M., Sakai, J., Kodama, T. and Gotoh, Y.** (2010) Wnt signaling and its downstream target N-myc regulate basal progenitors in the developing neocortex. *Development*, **137**, 1035-1044.
- Kwan, K. Y., Lam, M. M. S., Krsnik, Ž., Kawasaki, Y. I., Lefebvre, V. and Šestan, N.** (2008) SOX5 postmitotically regulates migration, postmigratory differentiation, and projections of subplate and deep-layer neocortical neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**, 16021-16026.
- Lai, T., Jabaudon, D., Molyneaux, B. J., Azim, E., Arlotta, P., Menezes, J. R. L. and Macklis, J. D.** (2008) SOX5 controls the sequential generation of distinct corticofugal neuron subtypes. *Neuron*, **57**, 232-247.
- Langdon, Y. G. and Mullins, M. C.** (2011) Maternal and zygotic control of zebrafish dorsoventral axial patterning. *Annual Review of Genetics*, **45**, 357-377.
- Lawson, A. and Schoenwolf, G. C.** (2009) Neurulation. In *Developmental Neurobiology* (ed. G. Lemke), pp. 3-9. Italy: Academic Press, Elsevier.
- Le Dréau, G. and Martí, E.** (2012) Dorsal–ventral patterning of the neural tube: A tale of three signals. *Developmental Neurobiology*, n/a-n/a.
- Lefebvre, V.** (2010) The SoxD transcription factors – Sox5, Sox6, and Sox13 – are key cell fate modulators. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **42**, 429-432.
- Lefebvre, V., Behringer, R. R. and de Crombrughe, B.** (2001) L-Sox5, Sox6 and Sox9 control essential steps of the chondrocyte differentiation pathway. *Osteoarthritis and Cartilage*, **9**, Supplement 1, S69-S75.
- Lefebvre, V., Li, P. and de Crombrughe, B.** (1998) A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *The EMBO journal*, **17**, 5718-5733.
- Lei, Q., Jeong, Y., Misra, K., Li, S., Zelman, A. K., Epstein, D. J. and Matisse, M. P.** (2006) Wnt signaling inhibitors regulate the transcriptional response to morphogenetic Shh-Gli signaling in the neural tube. *Developmental cell*, **11**, 325-337.
- Leung, J. Y., Kolligs, F. T., Wu, R., Zhai, Y., Kuick, R., Hanash, S., Cho, K. R. and Fearon, E. R.** (2002) Activation of AXIN2 expression by β -Catenin-T cell factor: a feedback repressor pathway regulating Wnt signaling. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 21657-21665.
- Li, V. S. W., Ng, S. S., Boersema, P. J., Low, T. Y., Karthaus, W. R., Gerlach, J. P., Mohammed, S., Heck, A. J. R., Maurice, M. M., Mahmoudi, T. and Clevers, H.** (2012) Wnt signaling through inhibition of β -catenin degradation in an intact Axin1 complex. *Cell*, **149**, 1245-1256.
- Liu, A. and Niswander, L. A.** (2005) Bone morphogenetic protein signalling and vertebrate nervous system development. *Nature Reviews Neuroscience*, **6**, 945-954.

- Lo, L. C., Johnson, J. E., Wuenschell, C. W., Saito, T. and Anderson, D. J.** (1991) Mammalian achaete-scute homolog 1 is transiently expressed by spatially restricted subsets of early neuroepithelial and neural crest cells. *Genes & Development*, **5**, 1524-1537.
- Locker, M., Agathocleous, M., Amato, M. A., Parain, K., Harris, W. A. and Perron, M.** (2006) Hedgehog signaling and the retina: insights into the mechanisms controlling the proliferative properties of neural precursors. *Genes and development*, **20**, 3036-3048.
- Logan, C. Y. and Nusse, R.** (2004) The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **20**, 781-810.
- Lopez-Rios, J., Esteve, P., Ruiz, J. and Bovolenta, P.** (2008) The Netrin-related domain of Sfrp1 interacts with Wnt ligands and antagonizes their activity in the anterior neural plate. *Neural Development*, **3**, 19.
- Lowery, L. A. and Sive, H.** (2004) Strategies of vertebrate neurulation and a re-evaluation of teleost neural tube formation. *Mechanisms of Development*, **121**, 1189-1197.
- Lustig, B., Jerchow, B., Sachs, M., Weiler, S., Pietsch, T., Karsten, U., van de Wetering, M., Clevers, H., Schlag, P. M., Birchmeier, W. and Behrens, J.** (2002) Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of Conductin/Axin2 in colorectal and liver tumors. *Molecular and Cellular Biology*, **22**, 1184-1193.
- Ma, Q., Sommer, L., Cserjesi, P. and Anderson, D. J.** (1997) Mash1 and neurogenin1 expression patterns define complementary domains of neuroepithelium in the developing CNS and are correlated with regions expressing Notch ligands. *The Journal of Neuroscience*, **17**, 3644-3652.
- Mansouri, A. and Gruss, P.** (1998) Pax3 and Pax7 are expressed in commissural neurons and restrict ventral neuronal identity in the spinal cord. *Mechanisms of Development*, **78**, 171-178.
- Martinez-Morales, P. L., Quiroga, A. C., Barbas, J. A. and Morales, A. V.** (2010) SOX5 controls cell cycle progression in neural progenitors by interfering with the WNT-[beta]-catenin pathway. *EMBO Rep*, **11**, 466-472.
- Megason, S. G. and McMahon, A. P.** (2002) A mitogen gradient of dorsal midline Wnts organizes growth in the CNS. *Development*, **129**, 2087-2098.
- Melichar, H. J., Narayan, K., Der, S. D., Hiraoka, Y., Gardiol, N., Jeannet, G., Held, W., Chambers, C. A. and Kang, J.** (2007) Regulation of $\gamma\delta$ Versus $\alpha\beta$ T Lymphocyte Differentiation by the Transcription Factor SOX13. *Science*, **315**, 230-233.
- Milla, L., Cortes, C., Hodar Q, C., Onate, M., Cambiazo, V., Burgess, S. and Palma, V.** (2012) Yeast-based assay identifies novel Shh/Gli target genes in vertebrate development. *BMC Genomics*, **13**, 2.
- Millen, K. J., Millonig, J. H. and Hatten, M. E.** (2004) Roof plate and dorsal spinal cord dl1 interneuron development in the dreher mutant mouse. *Developmental Biology*, **270**, 382-392.

- Morales, A. V., Barbas, J. A. and Nieto, M. A.** (2005) How to become neural crest: From segregation to delamination. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, **16**, 655-662.
- Morales, A. V., Perez-Alcala, S. and Barbas, J. A.** (2007) Dynamic Sox5 protein expression during cranial ganglia development. *Developmental Dynamics*, **236**, 2702-2707.
- Müller, T., Brohmann, H., Pierani, A., Heppenstall, P. A., Lewin, G. R., Jessell, T. M. and Birchmeier, C.** (2002) The homeodomain factor Lbx1 distinguishes two major programs of neuronal differentiation in the dorsal spinal cord. *Neuron*, **34**, 551-562.
- Muroyama, Y., Fujihara, M., Ikeya, M., Kondoh, H. and Takada, S.** (2002) Wnt signaling plays an essential role in neuronal specification of the dorsal spinal cord. *Genes & development*, **16**, 548-553.
- Murphy, E. C., Zhurkin, V. B., Louis, J. M., Cornilescu, G. and Clore, G. M.** (2001) Structural basis for SRY-dependent 46-X,Y sex reversal: modulation of DNA bending by a naturally occurring point mutation. *Journal of Molecular Biology*, **312**, 481-499.
- Nasevicius, A. and Ekker, S. C.** (2000) Effective targeted gene knockdown in zebrafish. *Nature Genetics*, **26**, 216-220.
- Niwa, H., Yamamura, K. and Miyazaki, J.** (1991) Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene*, 193-199.
- Nornes, H. O., Dressler, G. R., Knapik, E. W., Deutsch, U. and Gruss, P.** (1990) Spatially and temporally restricted expression of Pax2 during murine neurogenesis. *Development*, **109**, 797-809.
- Novitch, B. G., Wichterle, H., Jessell, T. M. and Sockanathan, S.** (2003) A requirement for retinoic acid-mediated transcriptional activation in ventral neural patterning and motor neuron specification. *Neuron*, **40**, 81-95.
- Nyholm, M. K., Wu, S.-F., Dorsky, R. I. and Grinblat, Y.** (2007) The zebrafish *zic2a-zic5* gene pair acts downstream of canonical Wnt signaling to control cell proliferation in the developing tectum. *Development*, **134**, 735-746.
- Okuda, Y., Ogura, E., Kondoh, H. and Kamachi, Y.** (2010) B1 SOX coordinate cell specification with patterning and morphogenesis in the early zebrafish embryo. *PLoS Genet*, **6**, e1000936.
- Oliver, T. G., Grasfeder, L. L., Carroll, A. L., Kaiser, C., Gillingham, C. L., Lin, S. M., Wickramasinghe, R., Scott, M. P. and Wechsler-Reya, R. J.** (2003) Transcriptional profiling of the Sonic hedgehog response: A critical role for N-myc in proliferation of neuronal precursors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **100**, 7331-7336.
- Park, H. C., Shin, J. and Appel, B.** (2004) Spatial and temporal regulation of ventral spinal cord precursor specification by Hedgehog signaling. *Development*, **131**, 5959-5969.

- Perez-Alcala, S., Nieto, M. A. and Barbas, J. A.** (2004) LSox5 regulates RhoB expression in the neural tube and promotes generation of the neural crest. *Development*, **131**, 4455-4465.
- Pevny, L. H. and Nicolis, S. K.** (2010) Sox2 roles in neural stem cells. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **42**, 421-424.
- Pfeffer, P. L., Gerster, T., Lun, K., Brand, M. and Busslinger, M.** (1998) Characterization of three novel members of the zebrafish Pax2/5/8 family: dependency of Pax5 and Pax8 expression on the Pax2.1 (noi) function. *Development*, **125**, 3063-3074.
- Pierani, A., Brenner-Morton, S., Chiang, C. and Jessell, T. M.** (1999) A Sonic hedgehog-independent, retinoid-activated pathway of neurogenesis in the ventral spinal cord. *Cell*, **97**, 903-915.
- Placzek, M. and Briscoe, J.** (2005) The floor plate: multiple cells, multiple signals. *Nature Reviews Neuroscience*, **6**, 230-240.
- Qian, L., Mahaffey, J. P., Alcorn, H. L. and Anderson, K. V.** (2011) Tissue-specific roles of Axin2 in the inhibition and activation of Wnt signaling in the mouse embryo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108**, 8692-8697.
- Reimer, M. M., Kuscha, V., Wyatt, C., Sörensen, I., Frank, R. E., Knüwer, M., Becker, T. and Becker, C. G.** (2009) Sonic hedgehog is a polarized signal for motor neuron regeneration in adult zebrafish. *The Journal of Neuroscience*, **29**, 15073-15082.
- Ribes, V. and Briscoe, J.** (2009) Establishing and interpreting graded Sonic hedgehog signaling during vertebrate neural tube patterning: the role of negative feedback. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **1**.
- Rimini, R., Beltrame, M., Argenton, F., Szymczak, D., Cotelli, F. and Bianchi, M. E.** (1999) Expression patterns of zebrafish sox11A, sox11B and sox21. *Mechanisms of Development*, **89**, 167-171.
- Ruiz, J. M., Rodríguez, J. and Bovolenta, P.** (2009) Growth and differentiation of the retina and the optic tectum in the medaka fish requires olSfrp5. *Developmental Neurobiology*, **69**, 617-632.
- Sandberg, M., Kallstrom, M. and Muhr, J.** (2005) Sox21 promotes the progression of vertebrate neurogenesis. *Nat Neurosci*, **8**, 995-1001.
- Savage, J., Conley, A. J., Blais, A. and Skerjanc, I. S.** (2009) SOX15 and SOX7 differentially regulate the myogenic program in P19 cells. *STEM CELLS*, **27**, 1231-1243.
- Schepers, G. E., Teasdale, R. D. and Koopman, P.** (2002) Twenty pairs of Sox: extent, homology, and nomenclature of the mouse and human Sox transcription factor gene families. *Developmental cell*, **3**, 167-170.
- Shen, S. P., Aleksic, J. and Russell, S.** (2013) Identifying targets of the Sox domain protein Dichaete in the Drosophila CNS via targeted expression of dominant negative proteins. *BMC Developmental Biology*, **13**.

- Shim, S., Kwan, K. Y., Li, M., Lefebvre, V. and Sestan, N.** (2012) Cis-regulatory control of corticospinal system development and evolution. *Nature*, **486**, 74-79.
- Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D'Amico, M., Pestell, R. and Ben-Ze'ev, A.** (1999) The cyclin D1 gene is a target of the β -catenin/LEF-1 pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **96**, 5522-5527.
- Sinner, D., Kordich, J. J., Spence, J. R., Opoka, R., Rankin, S., Lin, S.-C. J., Jonatan, D., Zorn, A. M. and Wells, J. M.** (2007) Sox17 and Sox4 differentially regulate β -Catenin/T-Cell Factor activity and proliferation of colon carcinoma cells. *Molecular and Cellular Biology*, **27**, 7802-7815.
- Smits, P., Li, P., Mandel, J., Zhang, Z., Deng, J. M., Behringer, R. R., de Crombrughe, B. and Lefebvre, V.** (2001) The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. *Developmental cell*, **1**, 277-290.
- Stolt, C. C., Lommes, P., Hillgärtner, S. and Wegner, M.** (2008) The transcription factor Sox5 modulates Sox10 function during melanocyte development. *Nucleic Acids Research*, **36**, 5427-5440.
- Stolt, C. C., Rehberg, S., Ader, M., Lommes, P., Riethmacher, D., Schachner, M., Bartsch, U. and Wegner, M.** (2002) Terminal differentiation of myelin-forming oligodendrocytes depends on the transcription factor Sox10. *Genes & development*, **16**, 165-170.
- Stolt, C. C., Schlierf, A., Lommes, P., Hillgartner, S., Werner, T., Kosian, T., Sock, E., Kessaris, N., Richardson, W. D., Lefebvre, V. and Wegner, M.** (2006) SoxD proteins influence multiple stages of oligodendrocyte development and modulate SoxE protein function. *Developmental Cell*, **11**, 697-709.
- Strähle, U., Lam, C. S., Ertzer, R. and Rastegar, S.** (2004) Vertebrate floor-plate specification: variations on common themes. *Trends in Genetics*, **20**, 155-162.
- ten Berge, D., Brugmann, S. A., Helms, J. A. and Nusse, R.** (2008) Wnt and FGF signals interact to coordinate growth with cell fate specification during limb development. *Development*, **135**, 3247-3257.
- Tetsu, O. and McCormick, F.** (1999) [beta]-Catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*, **398**, 422-426.
- Timmer, J., Chesnutt, C. and Niswander, L.** (2005) The Activin signaling pathway promotes differentiation of dl3 interneurons in the spinal neural tube. *Developmental Biology*, **285**, 1-10.
- Timmer, J. R., Wang, C. and Niswander, L.** (2002) BMP signaling patterns the dorsal and intermediate neural tube via regulation of homeobox and helix-loop-helix transcription factors. *Development*, **129**, 2459-2472.
- Uchikawa, M., Ishida, Y., Takemoto, T., Kamachi, Y. and Kondoh, H.** (2003) Functional analysis of chicken Sox2 enhancers highlights an array of diverse regulatory elements that are conserved in mammals. *Developmental cell*, **4**, 509-519.
- Ulloa, F. and Briscoe, J.** (2007) Morphogens and the control of cell proliferation and patterning in the spinal cord. *Cell Cycle*, **6**, 2640-2649.

- Valenta, T., Hausmann, G. and Basler, K.** (2012) The many faces and functions of B-catenin. *EMBO J*, advance online publication.
- Van Otterloo, E., Li, W., Garnett, A., Cattell, M., Medeiros, D. M. and Cornell, R. A.** (2012) Novel Tfp2-mediated control of soxE expression facilitated the evolutionary emergence of the neural crest. *Development*, **139**, 720-730.
- Vandepoele, K., De Vos, W., Taylor, J. S., Meyer, A. and Van de Peer, Y.** (2004) Major events in the genome evolution of vertebrates: Paranome age and size differ considerably between ray-finned fishes and land vertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 1638-1643.
- Verma-Kurvari, S., Savage, T., Smith, D. and Johnson, J. E.** (1998) Multiple elements regulate Mash1 expression in the developing CNS. *Developmental Biology*, **197**, 106-116.
- Voronova, A., Fischer, A., Ryan, T., Al Madhoun, A. and Skerjanc, I. S.** (2011) Ascl1/Mash1 is a novel target of Gli2 during Gli2-induced neurogenesis in P19 EC cells. *PLoS ONE*, **6**, e19174.
- Wang, H., Lei, Q., Oosterveen, T., Ericson, J. and Matisse, M. P.** (2011) Tcf/Lef repressors differentially regulate Shh-Gli target gene activation thresholds to generate progenitor patterning in the developing CNS. *Development*, **138**, 3711-3721.
- Wang, W., Chen, X., Xu, H. and Lufkin, T.** (1996) Msx3: a novel murine homologue of the Drosophila msh homeobox gene restricted to the dorsal embryonic central nervous system. *Mechanisms of Development*, **58**, 203-215.
- Wegner, M.** (2000) Transcriptional control in myelinating glia: The basic recipe. *Glia*, **29**, 118-123.
- Wegner, M.** (2010) All purpose Sox: The many roles of Sox proteins in gene expression. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **42**, 381-390.
- Wegner, M. and Stolt, C. C.** (2005) From stem cells to neurons and glia: a Soxist's view of neural development. *Trends in Neurosciences*, **28**, 583-588.
- Wilson, M. and Koopman, P.** (2002) Matching SOX: partner proteins and co-factors of the SOX family of transcriptional regulators. *Current Opinion in Genetics and Development*, **12**, 441-446.
- Wine-Lee, L., Ahn, K. J., Richardson, R. D., Mishina, Y., Lyons, K. M. and Crenshaw, E. B.** (2004) Signaling through BMP type 1 receptors is required for development of interneuron cell types in the dorsal spinal cord. *Development*, **131**, 5393-5403.
- Wullimann, M. F. and Rink, E.** (2002) The teleostean forebrain: a comparative and developmental view based on early proliferation, Pax6 activity and catecholaminergic organization. *Brain Research Bulletin*, **57**, 363-370.
- Yokoi, H., Kobayashi, T., Tanaka, M., Nagahama, Y., Wakamatsu, Y., Takeda, H., Araki, K., Morohashi, K.-I. and Ozato, K.** (2002) sox9 in a teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*): Evidence for diversified function of Sox9 in gonad differentiation. *Molecular Reproduction and Development*, **63**, 5-16.

- Yu, W., McDonnell, K., Taketo, M. M. and Bai, C. B.** (2008) Wnt signaling determines ventral spinal cord cell fates in a time-dependent manner. *Development*, **135**, 3687-3696.
- Zechner, D., Fujita, Y., Hülsken, J., Müller, T., Walther, I., Taketo, M. M., Bryan Crenshaw Iii, E., Birchmeier, W. and Birchmeier, C.** (2003) β -Catenin signals regulate cell growth and the balance between progenitor cell expansion and differentiation in the nervous system. *Developmental Biology*, **258**, 406-418.
- Zechner, D., Müller, T., Wende, H., Walther, I., Taketo, M. M., Crenshaw Iii, E. B., Treier, M., Birchmeier, W. and Birchmeier, C.** (2007) Bmp and Wnt/ β -catenin signals control expression of the transcription factor Olig3 and the specification of spinal cord neurons. *Developmental Biology*, **303**, 181-190.
- Zhou, R., Bonneaud, N., Yuan, C.-X., de Santa Barbara, P., Boizet, B., Tibor, S., Scherer, G., Roeder, R. G., Poulat, F. and Berta, P.** (2002) SOX9 interacts with a component of the human thyroid hormone receptor-associated protein complex. *Nucleic Acids Research*, **30**, 3245-3252.
- Zhuang, B. Q. and Sockanathan, S.** (2006) Dorsal–ventral patterning: a view from the top. *Current Opinion in Neurobiology*, **16**, 20-24.
- Zorn, A. M., Barish, G. D., Williams, B. O., Lavender, P., Klymkowsky, M. W. and Varmus, H. E.** (1999) Regulation of Wnt signaling by Sox proteins: XSox17 α/β and XSox3 physically interact with β -catenin. *Molecular Cell*, **4**, 487-498.

Anexos

Anexo I

Tabla 4. Funciones de los genes Sox.

Proteína	Función	Enfermedad	Especie
Sry	Determinación sexual (desarrollo de los testículos)	Disgénesis gonadal, reversión sexual	Ratón, humano
Sox1	Mantenimiento de progenitores neurales, diferenciación de neuronas ventrales del estriado		Ratón
Sox2	Mantenimiento de progenitores neurales, mantenimiento de neuronas en el hipotálamo, septum y estriado	Microftalmia, síndrome 3 de hipoplasia del nervio óptico (OMIM 206900), malformaciones del SNC	Ratón, pollo, <i>Xenopus</i> , humano
Sox3	Mantenimiento de progenitores neurales	Retraso mental, deficiencia de hormona del crecimiento asociada al cromosoma X (OMIM 300123), hipopituitarismo	Ratón, pollo, <i>Xenopus</i> , humano
Sox21	Diferenciación de los progenitores neurales		Ratón
Sox4	Adquisición de características panneurales		Ratón
Sox8	Determinación sexual, especificación de las CCN		Ratón, <i>Xenopus</i>
Sox9	Determinación sexual (desarrollo de los testículos), condrogénesis, diferenciación terminal de oligodendrocitos, especificación de células de cresta neural	Displasia campomélica con reversión sexual (OMIM 114290)	Ratón, pez medaka, <i>Xenopus</i> , pollo, pez cebra, humano
Sox10	Determinación sexual, condrogénesis, especificación de cresta neural, diferenciación terminal de oligodendrocitos, especificación de células de cresta neural, especificación del final de derivados de CCN: melanocitos, células de Schwann, neuronas del SN autónomo y neuronas sensoriales	Síndrome de Waardenburgh-Sha (OMIM 277580), síndrome de hipopigmentación sordera-ceguera (OMIM 601706), neuropatía periférica desmielinizante, leucodistrofia desmielinizante central, enfermedad de Hirschprung	Ratón, pez cebra, <i>Xenopus</i> , pollo, humano
Sox18		Síndrome de hipotricosis-limfedema-telangiectasia (OMIM 607823)	Ratón, humano
Sox5	Condrogénesis (diferenciación de condrocitos), bloqueo de la diferenciación terminal de oligodendrocitos, especificación de interneuronas corticofugales, delaminación de las CCN cefálica, inducción de salida de ciclo de los progenitores en TN, espermatogénesis	Gliomas: tumores cerebrales primarios, esclerosis sistémica, azoospermia, discapacidad intelectual, problemas de comportamiento	Ratón, pollo, pez cebra, humano
Sox6	Condrogénesis, bloqueo de la diferenciación terminal de oligodendrocitos, especificación de progenitores e interneuronas corticales		Ratón

Anexo II

Artículos publicados

1. Martínez-Morales, L. P., Quiroga, A. C., Barbas, J. A. & Morales, A. V. SOX5 controls cell cycle progression in neural progenitors by interfering with the WNT- β -catenin pathway. *EMBO reports*, 11:466-472 (2010)
2. Martínez-Morales, L. P., Díez del Corral, R., Olivera-Martínez, I., Quiroga, A. C., Das, R. M., Barbas, J. A., Storey, K. G. & Morales, A. V. FGF and RA activity gradients control the timing of neural crest cell emigration in the trunk. *Journal of Cell Biology*, 194 (3):489-503 (2011)
3. Quiroga, A. C., Stolt, C. C., Pérez-Alcalá, S., Sock, E., Barbas, J. A., Wegner, M. & Morales, A. V. Sox5 counteracts Wnt-promoted dorsal identity in the neural tube through the transcription of *Axin2*. (Enviado a *Development*)

SOX5 controls cell cycle progression in neural progenitors by interfering with the WNT- β -catenin pathway

Patricia L. Martinez-Morales, Alejandra C. Quiroga, Julio A. Barbas & Aixa V. Morales⁺

Instituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain

Genes of the SOX family of high-mobility group transcription factors are essential during nervous system development. In this study, we show that SOX5 is expressed by neural progenitors in the chick spinal cord and is turned off as differentiation proceeds. The overexpression of SOX5 in neural progenitors causes premature cell cycle exit and prevents terminal differentiation. Conversely, knocking down SOX5 protein extends the proliferative period of neural progenitors and causes marked cell death in a dorsal interneuron (dl3) population. Furthermore, SOX5 reduces WNT- β -catenin signalling, thereby triggering the expression of the negative regulator of the pathway axin2. We propose that SOX5 regulates the timing of cell cycle exit by opposing WNT- β -catenin activity on cell cycle progression.

Keywords: β -catenin; cell cycle; neurogenesis; SOX5; spinal cord
EMBO reports (2010) 11, 466–472. doi:10.1038/embo.2010.61

INTRODUCTION

During the development of the central nervous system, a large number of different neurons and glial cells are generated from a small population of self-renewing stem and progenitor cells. In the vertebrate spinal cord, mitotically active and post-mitotic cell populations are spatially segregated. Thus, neural progenitors are located in the medial ventricular zone and migrate laterally to the mantle zone on exiting the cell cycle, a site where differentiating cells accumulate.

A dorsal–ventral gradient of the WNT- β -catenin–TCF (T-cell factor) pathway positively regulates cell cycle progression of spinal neural progenitors through cyclin D1, cyclin D2 and N-MYC (Megason & McMahon, 2002).

However, it is still not clear how the progression of the proliferation programme, promoted by signals, such as WNT, can be counteracted to facilitate the initiation of the neurogenic programme. The high-mobility group box transcription factors of

the SOX gene family could be at the core of some of those processes, as they have essential regulatory functions during neurogenesis in the central nervous system (Wegner & Stolt, 2005). In the spinal cord, SOX1–3 proteins (SOXB1 group) preserve cells in an undifferentiated state (Bylund *et al*, 2003). By contrast, SOXB2 factors promote the initiation of the differentiation programme (Sandberg *et al*, 2005). SOX5 belongs to the SOXD group and is involved in the formation of the cephalic neural crest (Perez-Alcala *et al*, 2004), and in the control of the cell fate of distinct corticofugal neurons (Lai *et al*, 2008).

In this study, we show that SOX5 is expressed in neural progenitors in the spinal cord, and in dorsal dl3 interneurons. Through gain- and loss-of-function analyses, we observed that SOX5 controls the timing of cell cycle exit by neural progenitors at the G1–S transition by counteracting the mitotic effect of the WNT- β -catenin pathway. We provide evidence to suggest that SOX5 does this by controlling the feedback repressor pathway regulating WNT signalling. Furthermore, we have observed that SOX5 downregulation in post-mitotic cells is necessary for the progression of the differentiation programme. Hence, these data indicate SOX5 as an important brake on WNT- β -catenin mitogenic activity during the progression of neurogenesis.

RESULTS AND DISCUSSION

SOX5 is mainly expressed in neural progenitors

To determine the possible role of SOX5 in early neurogenesis, we defined the pattern of SOX5 expression at the mid-trunk level of the spinal cord in chicken embryos at Hamburger and Hamilton stages 10–24 (HH10–24). At HH10, when most of the neuro-epithelial cells are producing progenitors, very low levels of SOX5 were detected in these progenitors, whereas higher levels were observed in the dorsal premigratory neural crest cells (Fig 1A). By stage HH14, when around 12% of the neural progenitors have exited the cell cycle and have started differentiation at the marginal zone (Wilcock *et al*, 2007), SOX5 expression increased in progenitors (Fig 1B). Finally, from stages HH14 to HH24, when neural differentiation is more active and gliogenesis has not yet started, SOX5 expression disappeared from most of the interneurons that expressed the pan-neural marker HuC/D (Fig 1C,D). At stage HH24, SOX5 expression remained in neural progenitors

Instituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Doctor Arce 37, 28002 Madrid, Spain

⁺Corresponding author. Tel: +34 915854722; Fax: +34 915854754;

E-mail: aixamorales@cajal.csic.es

Received 22 September 2009; revised 26 March 2010; accepted 1 April 2010; published online 7 May 2010

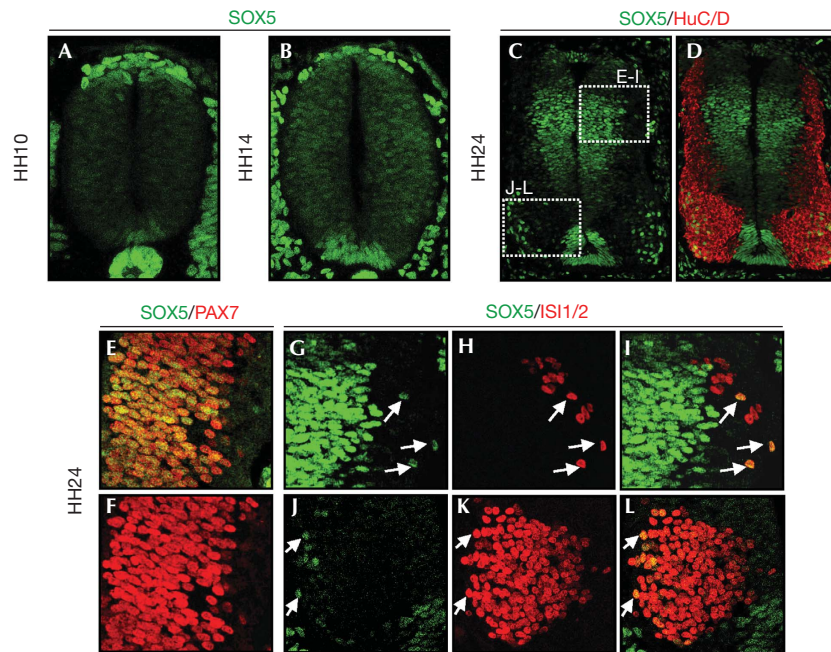


Fig 1 | Expression of SOX5 in the developing chick spinal cord. (A) At stage HH10, SOX5 is expressed dorsally in neural crest cells and in floor plate cells. (B) At stage HH14, SOX5 is expressed by most of the neuroepithelial cells. (C,D) SOX5 expression at HH24 is absent from most of the HuC/D-differentiating interneurons. (E,F) SOX5 is expressed in dorsal neural progenitors with PAX7. (G–I) A subpopulation of dorsal dl3 interneurons expresses SOX5 and islet 1/2 (arrows). (J–L) At HH24, SOX5 is expressed in a subpopulation of ISL1/2⁺ motoneurons (arrows). HH, Hamburger and Hamilton.

expressing PAX7 (Fig 1E,F). Dorsally, only islet 1/2⁺ dorsal interneurons (dl3) expressed SOX5 (Fig 1G–I). Ventrally, SOX5 was expressed by a small subpopulation of the islet 1/2⁺ motoneurons (Fig 1J–L). This dynamic pattern of expression suggests a possible role for SOX5 in the control of the transition from proliferation to differentiation.

SOX5 controls the timing of cell cycle exit

To explore the function of SOX5 in neurogenesis, we electroporated a pCAGGS-SOX5-IRES-GFP vector (pCIG-SOX5) and prematurely increased SOX5 levels (SOX5^{HIGH}) in neural progenitors at stages HH10–13. SOX5^{HIGH} provoked a $30.6 \pm 3.3\%$ decrease in the size of the electroporated right hemi-tube at 24 h post-electroporation (PE; stages HH14–17) when compared with the left control side (Fig 2E; supplementary Table S1 online) or with an electroporated control neural tube (pCIG; Fig 2A). There were no significant changes in cell density in SOX5-electroporated neural tubes (supplementary Table S1 online). The change in the hemitube size was due, in part, to a substantial decrease in proliferation observed by a reduction in bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation after a 40-min pulse (only $61 \pm 11\%$ incorporated BrdU; Fig 2B,F,I). It was also due to the number of cells in M-phase expressing phospho-histone H3 (PH3; only $73 \pm 13\%$; Fig 2C,G,I) in comparison with control embryos. This reduction was even more marked at 48 h PE (at stages HH19–23) when the proportion of PH3⁺ cells decreased to $46 \pm 7\%$ (Fig 2I) and that of BrdU⁺ cells fell to $59 \pm 9\%$ (Fig 2I). The reduction in proliferation in SOX5^{HIGH} cells was accompanied by an increase in apoptosis assessed by activated caspase 3 (Cas3*) expression

at 24 h ($260 \pm 20\%$; Fig 2I, supplementary Fig S1D online) and 48 h PE ($314 \pm 114\%$; Fig 2I) in relation to control cells (Fig 2I; supplementary Fig S1A online). Consequently, a premature increase in SOX5 reduces the total number of neuroepithelial cells due to both a reduction in cell proliferation and activation of apoptosis.

To explore further whether the neural cells with SOX5^{HIGH} had an altered cell cycle phenotype and not only an increased death rate, we analysed the cell cycle distribution of surviving cells by flow cytometry. After 24 h of SOX5 electroporation, the ratio of neuroepithelial cells accumulated in G0/G1 phases was increased by 23% with respect to control electroporated cells in G0/G1 (a 10% increase with respect to the total population; supplementary Fig S2A,B online). In accordance, the expression of cyclin D1 and N-MYC were severely reduced in neural progenitors (Fig 3H; data not shown).

To clarify whether neural progenitors overexpressing SOX5 were exiting the cell cycle (accumulated in G0) or were being retained in a longer G1 phase due to the reduction in cyclin D1 levels (Lange *et al*, 2009), cumulative BrdU labelling was performed (Nowakowski *et al*, 1989; Fig 2J). We found that SOX5^{HIGH} neural progenitors had a cell cycle length similar to pCIG control progenitors (14.8 and 14.4 h, respectively) and similar S-phase duration (4.5 and 4.7 h, respectively). However, there was a 12% decrease in the proportion of SOX5^{HIGH} cycling cells with respect to the control (growth fraction of 0.75 ± 0.03 versus 0.85 ± 0.05 ; Fig 2J). In conclusion, SOX5 promotes premature cell cycle exit in neural progenitors without significantly affecting cell cycle length.

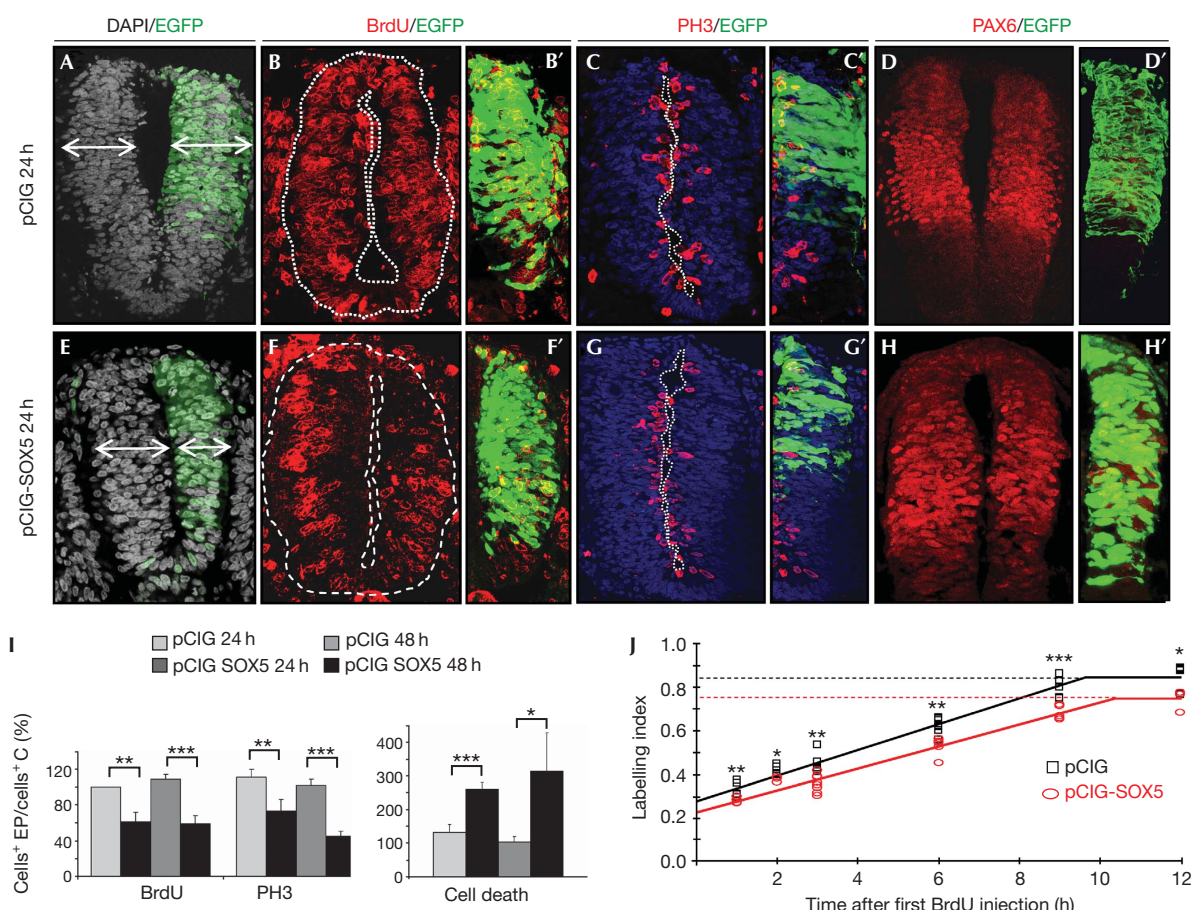


Fig 2 | Forced SOX5 expression promotes cell cycle exit. In relation to control pCIG embryos (A–C'), SOX5 misexpression (pCIG-SOX5; GFP, green on right side; E–H') in HH14–16 embryos caused a 30% reduction in the size of the hemitube (E), in the number of BrdU (F,F') and PH3-positive cells (G,G'), and an increase in activated caspase 3 (Cas3*)-positive dying cells (I). Expression of the neural progenitor marker PAX6 is not altered in SOX5^{HIGH} cells (H,H', D,D'). (I) Quantification of the effect 24 or 48 h PE. * $P < 0.01$; ** $P < 0.005$; *** $P < 0.001$. (J) Cumulative BrdU labelling curves of pCIG (black squares) or pCIG-SOX5 (red circles) electroporated neural tube cells. Dashed lines indicate the reduction in growth fractions. Mean of three embryos per experimental point, s.d. and t -test was calculated; *** $P < 0.01$; ** $P < 0.025$; * $P < 0.05$. BrdU, bromodeoxyuridine; C, control; EP, electroporated; GFP, green fluorescent protein; HH, Hamburger and Hamilton; pCIG, pCAGGS-IRES-GFP; PE, post-electroporation; PH3, phospho-histone H3.

As for the increase in apoptosis, we have found that although $53 \pm 8\%$ of the pCIG apoptotic cells were BrdU⁺ progenitors (after a 2-h pulse), only a $28 \pm 6\%$ of the SOX5^{HIGH} apoptotic cells were BrdU⁺. In addition, there were no changes in the number of apoptotic cells that expressed the differentiation marker HuC/D ($15 \pm 6\%$ for the pCIG and $13 \pm 4\%$ for the SOX5^{HIGH} apoptotic cells; data not shown). Furthermore, using the B-cell lymphoma 2 (BCL2) survival factor to rescue this cell death (Cayuso *et al*, 2006; supplementary Fig S1B–G online), we observed that neuroepithelial cells with high levels of SOX5 and BCL2 preferentially accumulated at G0/G1 (38% increase; supplementary Fig S2C,D online). Thus, apoptosis caused by SOX5 overexpression predominantly occurs in post-mitotic neural cells before they acquire definitive neuronal markers.

We next addressed whether SOX5 was not only sufficient but was also necessary to control the balance between cell proliferation and cell cycle exit. Knocking down SOX5 expression by specific

interfering short hairpin RNAs (pRFPRNAi-SOX5) caused a marked $66 \pm 4\%$ reduction in SOX5 protein levels at 48 h PE at HH19–22 (Fig 3A,B; supplementary Fig S3A online). Neural progenitors with reduced SOX5 levels, on using two different interfering RNAs (mi1 and mi2), presented a higher frequency of both BrdU incorporation (up to $114 \pm 7\%$; Fig 3C,D,G) and PH3 staining (up to $130 \pm 19\%$; Fig 3E–G). Furthermore, a small number of cells transfected with RNA-mediated interference (RNAi)-SOX5 and expressing PH3 were located in the mantle layer (insets in Fig 3F), suggesting that they entered mitosis in an ectopic position. In fact, reducing SOX5 levels increased cyclin D1 expression ($n=3$; Fig 3I). This could account for the appearance of ectopic mitosis as long-term forced expression of cyclin D1 leads to the appearance of proliferating cells in the differentiating field (Lobjois *et al*, 2008).

With respect to apoptosis, neural progenitors with low SOX5 levels presented up to a 2.4-fold increase in cell death when assessed by Cas3* expression and by the visualization of pyknotic

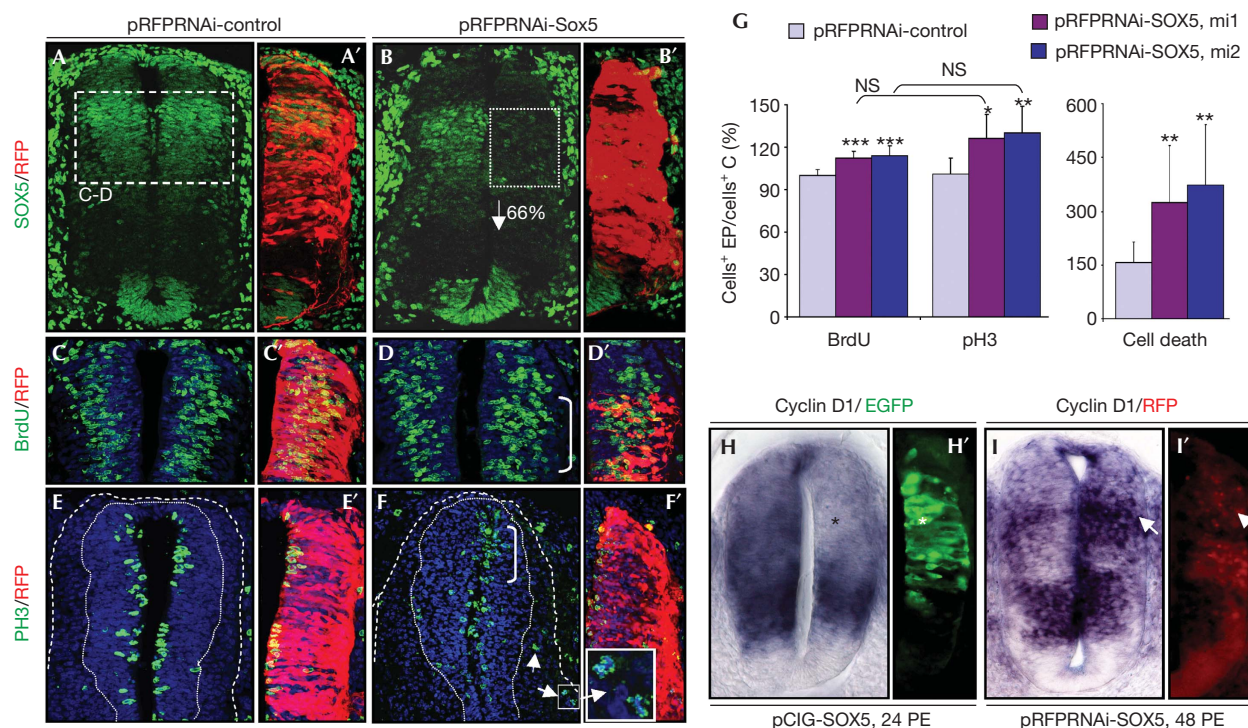


Fig 3 | SOX5 is necessary to control the timing of cell cycle exit. (A–G) Stage HH22, embryos analysed 48 h PE. (A–B') SOX5-specific shRNA (pRFPRNAi-SOX5, mi2) caused a 66% decrease in the endogenous levels of SOX5 protein (B,B') in relation to a pRFPRNAi-control (A,A'). (C–C') Knocking down SOX5 expression with mi2 increases the number of BrdU- (D,D') and PH3- (F,F') positive cells with respect to control (C,C', E,E'). Few proliferating RFP/PH3 double-positive cells are misallocated in the differentiated cell area (arrows in F, inset in F'). (G) Quantification of the effects using two shRNAs, mi1 and mi2. * $P < 0.05$; ** $P < 0.025$; *** $P < 0.01$. (H–I') SOX5 overexpression decreases cyclin D1 expression at stage HH14 (asterisk in H), whereas reduction of SOX5 levels induces cyclin D1 expression at stage HH18 (arrow in I,I'). C, control; EP, electroporation; HH, Hamburger and Hamilton; NS, not significant; pCIG, pCAGGS-IRES-GFP; PE, post-electroporation; PH3, phospho-histone H3; RFP, red fluorescent protein; shRNA, short hairpin RNA.

nuclei (Fig 3G). It is possible that cells forced to proliferate when SOX5 expression is compromised initiate apoptosis while going through the G2/M phases. In neural tubes expressing BCL2 and pRFPRNAi-SOX5, we observed a 51% increase in the ratio of cells accumulated in G2/M with respect to control neural tubes by using flow cytometry analysis (supplementary Fig S3C,D online). Altogether, this suggests that neural progenitors with reduced SOX5 expression are maintained for longer in a proliferative state, and a fraction of them die by apoptosis.

In summary, SOX5 negatively regulates cell cycle progression and it is necessary and sufficient to promote cell cycle arrest at the G1–S transition.

SOX5 interferes with β -catenin transcriptional activity

The WNT– β -catenin signalling pathway favours neural tube progenitor proliferation by directly controlling the transcription of the cell cycle regulators cyclin D1 and N-MYC (Tetsu & McCormick, 1999; ten Berge et al, 2008; Fig 4A,B).

To test whether SOX5 could control cell cycle exit by interfering with the WNT– β -catenin pathway, we electroporated SOX5 together with a more stable form of β -catenin (β -catenin^{CA}; Tetsu & McCormick, 1999), lacking one of the four phosphorylation sites that mediate axin/adomatous polyposis coli complex binding and degradation. As expected, neuroepithelial cells with β -catenin^{CA} displayed a higher proportion of cells in G2/M

with respect to the control (supplementary Fig S4A,B online). The expression of SOX5^{HIGH} reverted this situation, causing a 33% reduction in the ratio of progenitors in G2/M phases with respect to cells expressing β -catenin^{CA} alone (supplementary Fig S4B,C online). Furthermore, the increase in cyclin D1 and N-MYC expression mediated by β -catenin^{CA} was prevented in a cell-autonomous manner ($n = 3$; asterisk versus arrow in Fig 4E). In addition, cyclin D1 was expressed in adjacent non-electroporated cells probably by the induction of soluble signals coming from the cells electroporated with SOX5.

Conversely, knocking down SOX5 expression provoked a further 14% increase in the ratio of cells in the G2/M phase with respect to cells expressing β -catenin^{CA} alone (supplementary Fig S4D online). Thus, in neural progenitors with reduced SOX5 levels, the proliferative potential of the WNT pathway is reinforced.

Next, we determined that SOX5-induced changes in gene expression (Fig 4A–H) were due to alterations in the WNT canonical pathway activity, as we observed a $51 \pm 15\%$ decrease in the levels of the dephosphorylated active form of β -catenin (Fig 4I) in SOX5^{HIGH} cells with respect to control cells. Surprisingly, using the TOPFLASH reporter of WNT/ β -catenin transcriptional activity, in neural tube cells, we observed that SOX5 acted synergistically with β -catenin^{CA}, increasing TCF reporter activity by 3.4-fold with respect to β -catenin^{CA}, alone (supplementary Fig S5 online).

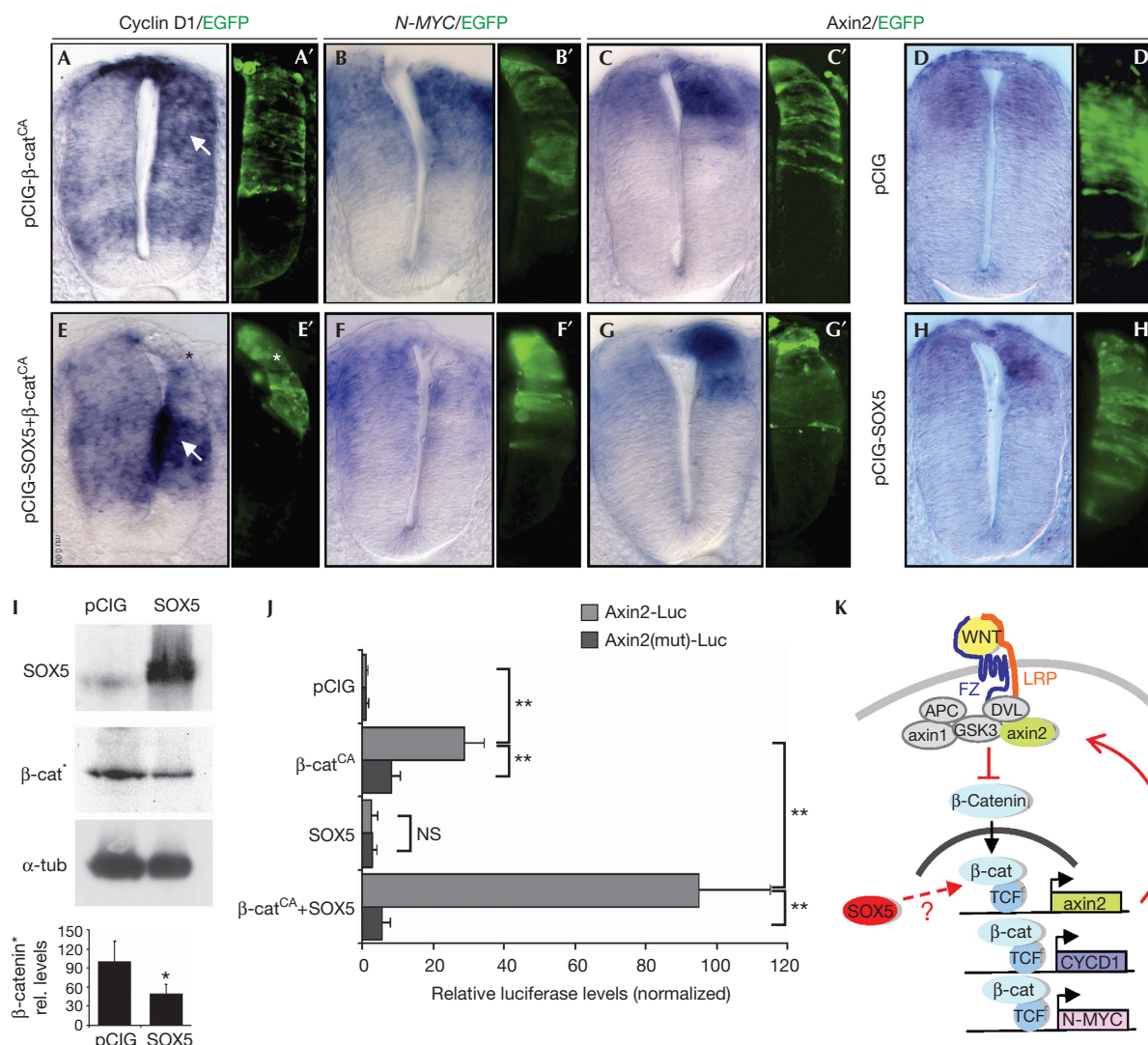


Fig 4 | SOX5 interferes with β -catenin transcriptional activity in the control of axin2 expression. (A–J) Stages HH14–16 embryos analysed at 24 h post-electroporation. Activation of the canonical WNT pathway by overexpressing a stabilized form of β -catenin (pCIG- β -cat^{CA}) promotes an upregulation of cyclin D1 (arrow in A,A'), *N-MYC* (B,B') and axin2 expression (C,C'). Forcing SOX5 expression together with pCIG- β -cat^{CA} represses cyclin D1 (asterisk versus arrow in E,E') and *N-MYC* (F,F') expression and induces axin2 expression (G,G'). SOX5^{HIGH} alone also induces axin2 expression (D,D' compared with H,H'). (I) SOX5 overexpression reduces active β -catenin levels (β -cat*) to 49 % of those in pCIG-electroporated cells. Values were normalized using α -tubulin as a reference (α -tub). * $P < 0.005$. (J) Quantitative analysis of the transcriptional activity of SOX5 alone or in combination with β -catenin^{CA} on an intact axin2 promoter (lighter bars) or on a TCF-binding site mutated one (darker bars). Graphs show normalized luciferase units relative to the pCIG control. Each bar represents mean \pm s.e.m. of triplicate experiments. ** $P < 0.001$. (K) Model for SOX5 action on the WNT signalling pathway in the spinal cord (see main text). DVL, dishevelled; FZ, frizzled; GSK3, glycogen synthase kinase 3; HH, Hamburger and Hamilton; pCIG, pCAGGS-IRES-GFP; TCF, T-cell factor.

To reconcile these apparently opposing results, we analysed the transcription of negative regulators of the WNT pathway, such as axin2 (Leung *et al*, 2002). By using the luciferase reporter system under the control of 1 kb of the axin2 promoter (with a functional TCF-binding site; Leung *et al*, 2002), we found that SOX5 acted synergistically with β -catenin^{CA}, increasing axin2 promoter activity by 3.3-fold with respect to β -catenin^{CA} alone (Fig 4J). In fact, this SOX5 function is dependent on the TCF-binding site in the axin2 promoter (Fig 4J). Furthermore, axin2 was overexpressed in the dorsal progenitors expressing SOX5^{HIGH} alone (Fig 4H) and/or with β -catenin^{CA} (Fig 4G,C) in relation to the

control (Fig 4D). In conclusion, SOX5 enhances TCF/ β -catenin activity on the transcription of axin2 in neural progenitors.

The increased levels of axin2 could mediate the reduction in the active form of β -catenin observed in these cells and consequently downregulate the expression of cyclin D1 and *N-MYC*, leading to cell cycle exit (Fig 4K). Obviously, axin2 transcription would also be affected by a reduction in the active form of β -catenin. A plausible interpretation for the elevated levels of axin2 messenger RNA would be that SOX5 was enhancing/stabilizing TCF/ β -catenin transcriptional activity preferentially in the context of the axin2 promoter, compensating for the reduction

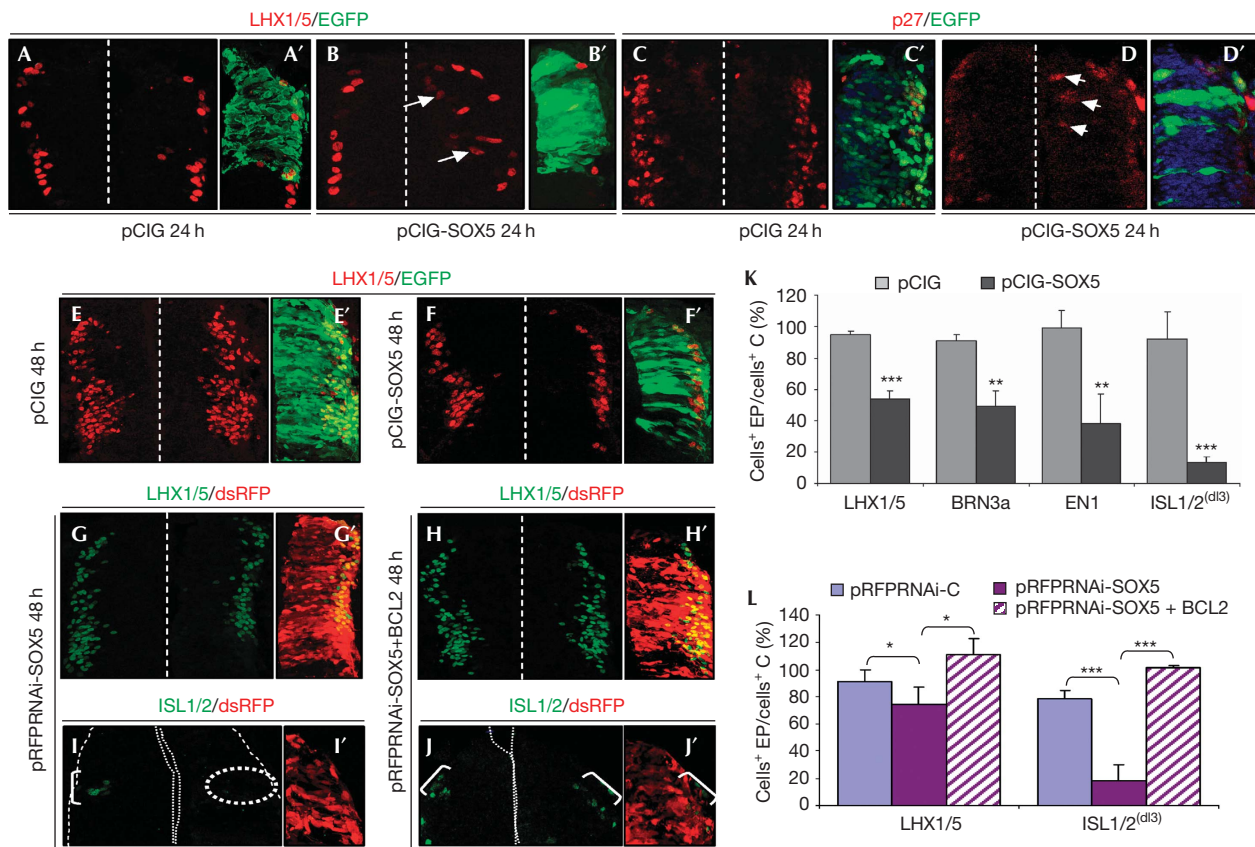


Fig 5 | Downregulation of SOX5 expression is required for the progression of dorsal interneuron differentiation. (A–D') Sustained elevation of SOX5 in stage HH14–16 embryos induces ectopic activation of LHX1/5 (arrows; B,B') and p27^{kip1} (arrows in D,D') in neurons before they reach the mantle zone, with respect to control pCIG cells (A,A', C,C'). (E,F,K) At stages HH18–22, there was a reduction in the number of LHX1/5⁺ (F,F'), BRN3a⁺, EN1⁺ and ISL1/2⁺ interneurons (K). (G,I,L) At stages HH18–22, knocking down SOX5 expression (mi2, red) affects the number of LHX1/5⁺ (G,G',L) and ISL1/2⁺ interneurons (I,I',L). (H–J,L) Co-electroporation with BCL2 rescues the total number of (K) LHX1/5⁺ and (brackets in L) ISL1/2⁺ interneurons. Quantification of the number of cells expressing a given neuronal marker at 48 h PE with the indicated construct. **P* < 0.05; ***P* < 0.003; ****P* < 0.001. C, control; EP, electroporation; HH, Hamburger and Hamilton; ISL1/2, islet 1/2; pCIG, pCAGGS-IRES-GFP; PE, post-electroporation.

in active β -catenin. There are examples of SOX genes, such as *SOX4*, which enhance TCF/ β -catenin activity and might function to stabilize β -catenin (Sinner *et al*, 2007). We cannot exclude that in the context of cyclin D1 or *N-MYC* promoter, SOX5 could reduce TCF/ β -catenin activity, as the same SOX protein can exert a different transcriptional modulation in distinct genes, depending on the developmental scenario (Wegner & Stolt, 2005).

Regulated of SOX5 expression is required for differentiation

Proliferation and differentiation are highly coordinated events that can be uncoupled on occasion. To determine whether this was the case after SOX5 premature expression, specific markers of dorsal and ventral interneurons were analysed (Jessell, 2000). Neural progenitors with SOX5^{HIGH} generated neurons that prematurely expressed LHX1/5 (dl2, dl4 and dl6 dorsal and V0 and V2 ventral interneurons; Martí *et al*, 2006), before reaching the mantle zone (*n* = 4/8; Fig 5B). Furthermore, they ectopically expressed the cell cycle inhibitor p27^{kip1} (*n* = 3; Fig 5C,D). However, there was a marked reduction in LHX1/5⁺ interneurons located in the mantle zone 24 h (*n* = 8/8; Fig 5B) and 48 h (54 ± 5% remained; *n* = 4; Fig 5E,F,K) after maintaining SOX5^{HIGH}. A similar reduction was

observed for BRN3a⁺ interneurons (dl3 and dl5; 49 ± 10%; *n* = 3; Fig 5K), and for the EN1⁺ V1 interneurons (38 ± 19%; *n* = 4; Fig 5K). More markedly, only 13 ± 4% of the ISL1/2⁺ interneurons (dl3) remained (*n* = 3; Fig 5K). Reducing apoptosis with the anti-apoptotic protein BCL2 did not significantly recover the reduced populations of LHX1/5⁺ and BRN3a⁺ interneurons, and only partly rescued that of ISL1/2⁺ interneurons (35 ± 7% remained; supplementary Fig S6A–E online). In conclusion, progenitors with SOX5^{HIGH} were forced to exit the cell cycle, generated neurons that prematurely expressed differentiation markers and around half of neurons fail to complete the differentiation programme.

However, it has been shown that forcing progenitors to continue to cycle does not prevent cells from differentiating into the right cell type (Dyer & Cepko, 2000; Lobjois *et al*, 2008). In fact, knocking down SOX5 levels does not alter the hemitube thickness and only mildly alters the gross pattern of differentiation, as it slightly reduced the number of LHX1/5⁺ interneurons (16% reduction; *n* = 5; Fig 5G,L) and reduced the number of the small population of ISL1/2⁺ dl3 interneurons (by 82%; *n* = 3; Fig 5I,L). The reduction in the number of LHX1/5⁺ and ISL1/2⁺ neurons was totally rescued by BCL2 protein (Fig 5H,J,L). As the apoptosis

is not fully overcome by BCL2 expression (supplementary Fig S3D online), these results would suggest that progenitors with reduced levels of SOX5 remain cycling for longer and probably generate an increased number of LHX1/5⁺ differentiated interneurons, similar to cyclin D1-transfected neural progenitors (Lobjois *et al*, 2008). The possible excess of LHX1/5⁺ interneurons would have been overcompensated by apoptosis.

In summary, these results suggest that (i) SOX5 is sufficient to induce premature cell cycle exit but it prevents the progression of the interneuron differentiation programme; (ii) SOX5 is required for the timing of cell cycle exit and for the correct final number of dorsal interneurons; and (iii) SOX5 is essential for the survival of d13 interneurons that normally express high level of SOX5.

Our data, to our knowledge, establish, for the first time in a neural context, both the role of a SOX transcription factor in the timing of cell cycle exit and in the modulation of the WNT– β -catenin pathway to control that function. By increasing the levels of the negative regulator axin2, SOX5 would control the feedback repressor pathway regulating WNT signalling (Leung *et al*, 2002).

Several SOX proteins fulfil crucial roles in the context of neurogenesis. SOXB1 promotes progenitor cell maintenance (Bylund *et al*, 2003), whereas SOXB2 promotes the onset of neuronal differentiation (Sandberg *et al*, 2005). Our studies assign a role for SOX5 between the activity of SOXB1 and SOXB2 proteins, as SOX5 promotes cell cycle exit of neural progenitors and its downregulation is required for the progression of neuronal differentiation.

METHODS

Chick *in ovo* electroporation. Embryos were electroporated at stages HH10–13 and processed 24 h PE (HH14–17) or 48 h PE (HH19–22) as previously described (Perez-Alcala *et al*, 2004), by using immunohistochemistry, *in situ* hybridization, western blotting, fluorescent associated cell sorting or luciferase assays.

Fluorescent associated cell sorting (FACS). Electroporated neural tubes, carrying green fluorescent protein as the reporter, were dissociated into a single-cell suspension 24–48 h later as described previously (Cayuso *et al*, 2006). Nuclei were labelled with propidium iodide to estimate DNA content in GFP⁺ cells. Flow cytometry data were collected and multiparameter analysis was performed in an EPICS XL Coulter Cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA).

Luciferase reporter assay. Transcriptional activity assays were performed in embryos electroporated with the indicated DNAs, together with 1 kb of axin2 promoter in a luciferase reporter construct (Leung *et al*, 2002) and two *Renilla* luciferase reporter constructs each carrying the cytomegalovirus and the simian virus 40 promoter (Promega, Southampton, UK) for normalization. Luciferase activities were measured by the Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega).

Statistical analysis. All data presented here are number of cells in the electroporated (EP) area that expresses a marker with respect to the cells expressing the same marker in an equivalent area (control; C) on the non-electroporated side (% cells⁺ EP/cells⁺ C). Quantitative data were expressed as mean \pm s.d. or s.e.m.; $n \geq 3$ embryos per experimental point. Significant differences were tested by Student's *t*-test.

Supplementary information is available at *EMBO reports* online (<http://www.emboreports.org>).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank B. Lázaro and A. Arias for technical assistance; P. Bovolenta for her support and together with A.M. Nieto and R. Diez del Corral for discussions; E. Martí for β -catenin^{CA} and BCL2 constructs, E. Fearon for the axin2 promoter, R. Nowakowski for the Excel spreadsheet to calculate cell cycle length, H. Kondoh for *N-MYC* complementary DNA and S.A. Wilson for the pRFPRNAi vector. This work is supported by the Spanish Ministry of Science grants to A.V.M. (BFU2005-00762 and BFU2008-02963). A.V.M. was supported by Ramon y Cajal Programme, P.L.M.-M. and A.C.Q. by Spanish Ministry of Science fellowships.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- Bylund M, Andersson E, Novitsch BG, Muhr J (2003) Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1–3 activity. *Nat Neurosci* **6**: 1162–1168
- Cayuso J, Ulloa F, Cox B, Briscoe J, Martí E (2006) The Sonic hedgehog pathway independently controls the patterning, proliferation and survival of neuroepithelial cells by regulating Gli activity. *Development* **133**: 517–528
- Dyer MA, Cepko CL (2000) p57/Kip2 regulates progenitor cell proliferation and amacrine interneuron development in the mouse retina. *Development* **127**: 3593–3605
- Jessell TM (2000) Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet* **1**: 20–29
- Lai T, Jabaudon D, Molyneaux BJ, Azim E, Arlotta P, Menezes JR, Macklis JD (2008) SOX5 controls the sequential generation of distinct corticofugal neuron subtypes. *Neuron* **57**: 232–247
- Lange C, Huttner WB, Calegari F (2009) Cdk4/cyclinD1 overexpression in neural stem cells shortens G1, delays neurogenesis, and promotes the generation and expansion of basal progenitors. *Cell Stem Cell* **5**: 320–331
- Leung JY, Kolligs FT, Wu R, Zhai Y, Quirk R, Hanash S, Cho KR, Fearon ER (2002) Activation of AXIN2 expression by beta-catenin–T cell factor. *J Biol Chem* **277**: 21657–21665
- Lobjois V, Bel-Vialar S, Trousse F, Pituello F (2008) Forcing neural progenitor cells to cycle is insufficient to alter cell-fate decision and timing of neuronal differentiation in the spinal cord. *Neural Dev* **3**: 4
- Martí E, García-Campmany L, Bovolenta P (2006) *Dorso-Ventral Patterning of the Vertebrate Central Nervous System*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH
- Megason SG, McMahon AP (2002) A mitogen gradient of dorsal midline Wnts organizes growth in the CNS. *Development* **129**: 2087–2098
- Nowakowski RS, Lewin SB, Miller MW (1989) Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. *J Neurocytol* **18**: 311–318
- Perez-Alcala S, Nieto MA, Barbas JA (2004) LSox5 regulates RhoB expression in the neural tube and promotes generation of the neural crest. *Development* **131**: 4455–4465
- Sandberg M, Kallstrom M, Muhr J (2005) Sox21 promotes the progression of vertebrate neurogenesis. *Nat Neurosci* **8**: 995–1001
- Sinner D, Kordich JJ, Spence JR, Opoka R, Rankin S, Lin SC, Jonatan D, Zorn AM, Wells JM (2007) Sox17 and Sox4 differentially regulate beta-catenin/T-cell factor activity and proliferation of colon carcinoma cells. *Mol Cell Biol* **27**: 7802–7815
- ten Berge D, Brugmann SA, Helms JA, Nusse R (2008) Wnt and FGF signals interact to coordinate growth with cell fate specification during limb development. *Development* **135**: 3247–3257
- Tetsu O, McCormick F (1999) Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* **398**: 422–426
- Wegner M, Stolt CC (2005) From stem cells to neurons and glia: a Soxist's view of neural development. *Trends Neurosci* **28**: 583–588
- Wilcock AC, Swedlow JR, Storey KG (2007) Mitotic spindle orientation distinguishes stem cell and terminal modes of neuron production in the early spinal cord. *Development* **134**: 1943–1954

FGF and retinoic acid activity gradients control the timing of neural crest cell emigration in the trunk

Patricia L. Martínez-Morales,¹ Ruth Díez del Corral,¹ Isabel Olivera-Martínez,² Alejandra C. Quiroga,¹ Raman M. Das,² Julio A. Barbas,¹ Kate G. Storey,² and Aixa V. Morales¹

¹Instituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 28002 Madrid, Spain

²College of Life Sciences, University of Dundee, Dundee DD1 5EH, Scotland, UK

Coordination between functionally related adjacent tissues is essential during development. For example, formation of trunk neural crest cells (NCCs) is highly influenced by the adjacent mesoderm, but the molecular mechanism involved is not well understood. As part of this mechanism, fibroblast growth factor (FGF) and retinoic acid (RA) mesodermal gradients control the onset of neurogenesis in the extending neural tube. In this paper, using gain- and loss-of-function experiments, we show that caudal FGF signaling prevents premature specification of NCCs and, consequently, premature

epithelial–mesenchymal transition (EMT) to allow cell emigration. In contrast, rostrally generated RA promotes EMT of NCCs at somitic levels. Furthermore, we show that FGF and RA signaling control EMT in part through the modulation of elements of the bone morphogenetic protein and Wnt signaling pathways. These data establish a clear role for opposition of FGF and RA signaling in control of the timing of NCC EMT and emigration and, consequently, coordination of the development of the central and peripheral nervous system during vertebrate trunk elongation.

Introduction

The neural crest is formed by a transient population of multipotent cells that arises from the dorsal neural tube. Once specified, neural crest cells (NCCs) undergo a process of epithelial–mesenchymal transition (EMT) that confers the ability to delaminate and migrate away from the dorsal neural tube. The NCCs migrate along characteristic pathways to differentiate into a wide variety of derivatives according to their rostro-caudal (R-C) position in the neural tube and to the order of emigration (Krispin et al., 2010). NCC derivatives include craniofacial skeleton, sensory neurons and glia, sympathetic neurons, and melanocytes, among others (Le Douarin and Kalcheim, 1999).

The process of neural crest formation implies the orchestration of a complex gene regulatory network (Morales et al., 2005; Sauka-Spengler and Bronner-Fraser, 2008). It involves signaling pathways and transcription factors that are responsible

for the sequence of early induction of the NCC during gastrulation (Wnt, bone morphogenetic proteins [BMPs], FGF, and retinoic acid [RA]; Liem et al., 1995; Saint-Jeannet et al., 1997; Villanueva et al., 2002; Monsoro-Burq et al., 2003), the specification of the neural plate border (*Msx1/2*, *Pax3*, *Pax7*, and *Zic1/3*; Liem et al., 1995; Nakata et al., 1997; Brewster et al., 1998), the expression of bona fide NCC transcription factors (*AP2*, *Snail2*, *FoxD3*, *Sox5*, *Sox9*, and *Sox10*; Nieto et al., 1994; Dottori et al., 2001; Kos et al., 2001; Paratore et al., 2001; Cheung and Briscoe, 2003; Barralho-Gimeno et al., 2004; Perez-Alcala et al., 2004), and the regulation of numerous downstream effectors involved in cell adhesion and cell cycle control, among others (Sauka-Spengler and Bronner-Fraser, 2008).

Several neural crest specifier genes are coexpressed with neural plate border specifiers at early stages during gastrulation, suggesting possible early regulatory relationships (Khudyakov and Bronner-Fraser, 2009). However, this early population of neural crest progenitors mostly represents the cephalic NCCs, whereas the trunk neural crest progenitors will progressively be specified as the trunk neural tube elongates (Le Douarin and

P.L. Martínez-Morales and R. Díez del Corral contributed equally to this paper. Correspondence to Aixa V. Morales: aixamorales@cajal.csic.es

I. Olivera-Martínez's present address is Centre National de la Recherche Scientifique, Université Pierre et Marie Curie, 75252 Paris, Cedex 05, France.

Abbreviations used in this paper: BMP, bone morphogenetic protein; EMT, epithelial–mesenchymal transition; ERK, extracellular signal-regulated kinase; FGFR, FGF receptor; GPI, glycosylphosphatidylinositol; HH, Hamburger and Hamilton; IRES, internal ribosome entry site; NCC, neural crest cell; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PSM, presomitic mesoderm; RA, retinoic acid; RAR, RA receptor; RARE, RA response element; R-C, rostro-caudal; VAD, vitamin A deficient; VEGFR, VEGF receptor.

© 2011 Martínez-Morales et al. This article is distributed under the terms of an Attribution–Noncommercial–Share Alike–No Mirror Sites license for the first six months after the publication date [see <http://www.rupress.org/terms>]. After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution–Noncommercial–Share Alike 3.0 Unported license, as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>).

Supplemental Material can be found at:
<http://jcb.rupress.org/content/suppl/2011/07/29/jcb.201011077.DC1.html>
Original image data can be found at:
<http://jcb-dataviewer.rupress.org/jcb/browse/3651>

Kalcheim, 1999). In that sense, the role of BMP, FGF, and Wnt signaling in the early NCC induction has been derived from work in *Xenopus laevis* at cephalic NCC territory. Thus, the signal-promoting trunk neural crest specification has not been fully elucidated.

The development of trunk NCCs is highly coordinated with the development of functionally related adjacent territories. In particular, flanking the neural tube, the paraxial or presomitic mesoderm (PSM) gets progressively segmented into smaller units, somites, and this metamerization imposes a segmented organization to the trunk NCCs. First, opposite the PSM, NCCs are confined to the dorsal neural tube, whereas NCC emigration begins facing epithelial somites (Teillet et al., 1987; Sela-Donenfeld and Kalcheim, 1999). Moreover, the first indication of peripheral nervous system segmentation is the patterned ventral migration of NCCs through the anterior part of each somitic sclerotome (Tosney, 1978; Rickmann et al., 1985; Bronner-Fraser, 1986; Loring and Erickson, 1987).

There is little knowledge about the integration of signals involved in trunk NCC emigration. At trunk level, it has been shown that a BMP-Wnt1 signaling cascade controls NCC emigration (Sela-Donenfeld and Kalcheim, 1999; Burstyn-Cohen et al., 2004). The regulation of that cascade is exerted through the caudal (high)-rostral (low) gradient of the BMP inhibitor Noggin, which in turn is controlled by undetermined signals coming from somites (Sela-Donenfeld and Kalcheim, 2000).

In the paraxial mesoderm, the FGF and RA pathways operate as a signaling switch that controls the R-C sequence of mesodermal and neural development. Opposite gradients of declining caudal FGF and rostral RA signaling in the extending body axis create a wavefront, which determines the onset of neuronal differentiation and patterning in newly generated spinal cord (Diez del Corral et al., 2002, 2003) and also positions somite boundaries (Dubrulle et al., 2001; Diez del Corral et al., 2003). The trunk neural tube is generated during a long period of time as the main body axis extends caudally, and trunk neural crest is also generated after this R-C sequence. Thus, FGF and RA signaling pathways are candidates to coordinate NCC development with somite and neuron formation as the embryo elongates.

In this work, using both gain- and loss-of-function approaches, we establish that FGF signaling through the MAPK pathway prevents the initiation of trunk NCC specification and, consequently, NCC EMT. In contrast, RA signaling triggers the EMT of specified NCCs. Furthermore, we show that FGF and RA signaling control the timing of EMT and emigration in part through modulation of elements of the BMP and Wnt signaling pathways. Thus, opposition of FGF and RA signaling orchestrates the onset of trunk NCC specification and emigration, coordinating them with somite formation and neurogenesis in the extending vertebrate body axis.

Results

Onset of NCC marker expression coincides with FGF8 decline

To investigate whether the paraxial mesoderm has a general influence on NCC specification and migration in the spinal cord, we compared the expression patterns of a cohort of genes involved

in dorsal patterning and NCC specification with respect to the formation of somites in chicken embryos at Hamburger and Hamilton (HH) stages 10–14 (Fig. 1, A–G). At the HH10 stage, the caudal open neural plate expressed dorsal patterning genes such as *Pax7* (Fig. 1 A; Kawakami et al., 1997), *Pax3* (not depicted; Goulding et al., 1991), *RhoB* (not depicted; Liu and Jessell, 1998), and *Msx1* (not depicted; Liem et al., 1995). This expression is maintained along the neural tube as the body axis extends (Fig. 1 A). More rostrally, when the neural folds move toward the midline to fuse, the expression of the NCC marker *Snail2* (Nieto et al., 1994) was found in the dorsal neural folds (Fig. 1 B) adjacent to the mid-PSM level. Subsequently, expression of *Sox* family genes involved in NCC formation could be observed in the dorsal neural tube. First, *Sox9* (Fig. 1 C; Cheung and Briscoe, 2003) appeared rostral to the initiation of *Snail2* and then *Sox5* (Fig. 1 D; Perez-Alcala et al., 2004). Finally, adjacent to forming somites, *Sox10* (Fig. 1 E; Paratore et al., 2001) was observed in premigratory NCCs about to emigrate.

This order in the expression of the genes described is maintained throughout stages HH12–14 (unpublished data). However, at HH10, *FoxD3*, an NCC specifier (Stewart et al., 2006), was not expressed dorsally in the neural folds (Fig. 1 F). Only by HH12 could *FoxD3* mRNA be observed at the rostral PSM level (Fig. 1 G).

The initiation of the expression of NCC markers seems to coincide with the transition zone where neural progenitors stop expressing caudal neural markers and initiate ventral patterning gene expression. This transition is governed by the opposing activities of the FGF and RA signaling gradients (Diez del Corral et al., 2003). In fact, by in situ hybridization of half embryos, we showed that the onset of *Snail2* expression coincided with the decline of the caudal neural gene *Sax1* expression (Fig. 1 H; Bertrand et al., 2000) and the appearance of the ventral patterning gene *Pax6* (Fig. 1 I; Bertrand et al., 2000). Moreover, the initiation of *Snail2* expression is close to the decay of *FGF8* transcripts in the neural tube (Fig. 1 K), and high levels of *Snail2* mRNA coincided with the onset of the RA-synthesizing enzyme *Raldh2* expression in the adjacent mesoderm (Fig. 1 J).

In summary, NCC markers are progressively transcribed in a precise temporal-spatial order in the presumptive region of premigratory NCCs. Moreover, these data suggest that the onset of specification and EMT of NCCs could be controlled by FGF and RA signaling gradients (Fig. 1 L).

FGF signaling controls the onset of trunk NCC specification through the MAPK pathway

FGF signaling is involved in the maintenance of the neural caudal stem zone, and it also represses neuronal differentiation and ventral patterning (Bertrand et al., 2000; Diez del Corral et al., 2003). To determine whether the onset of NCC specification was regulated by the decline of the caudal gradient of FGF8 signaling, we used the FGF receptor (FGFR) type 1 (FGFR1) antagonist SU5402 (Mohammadi et al., 1997). Cultured HH11 embryos exposed to this drug for 4 h exhibited a severe downregulation of the well-known FGF signaling target *Sprouty2*

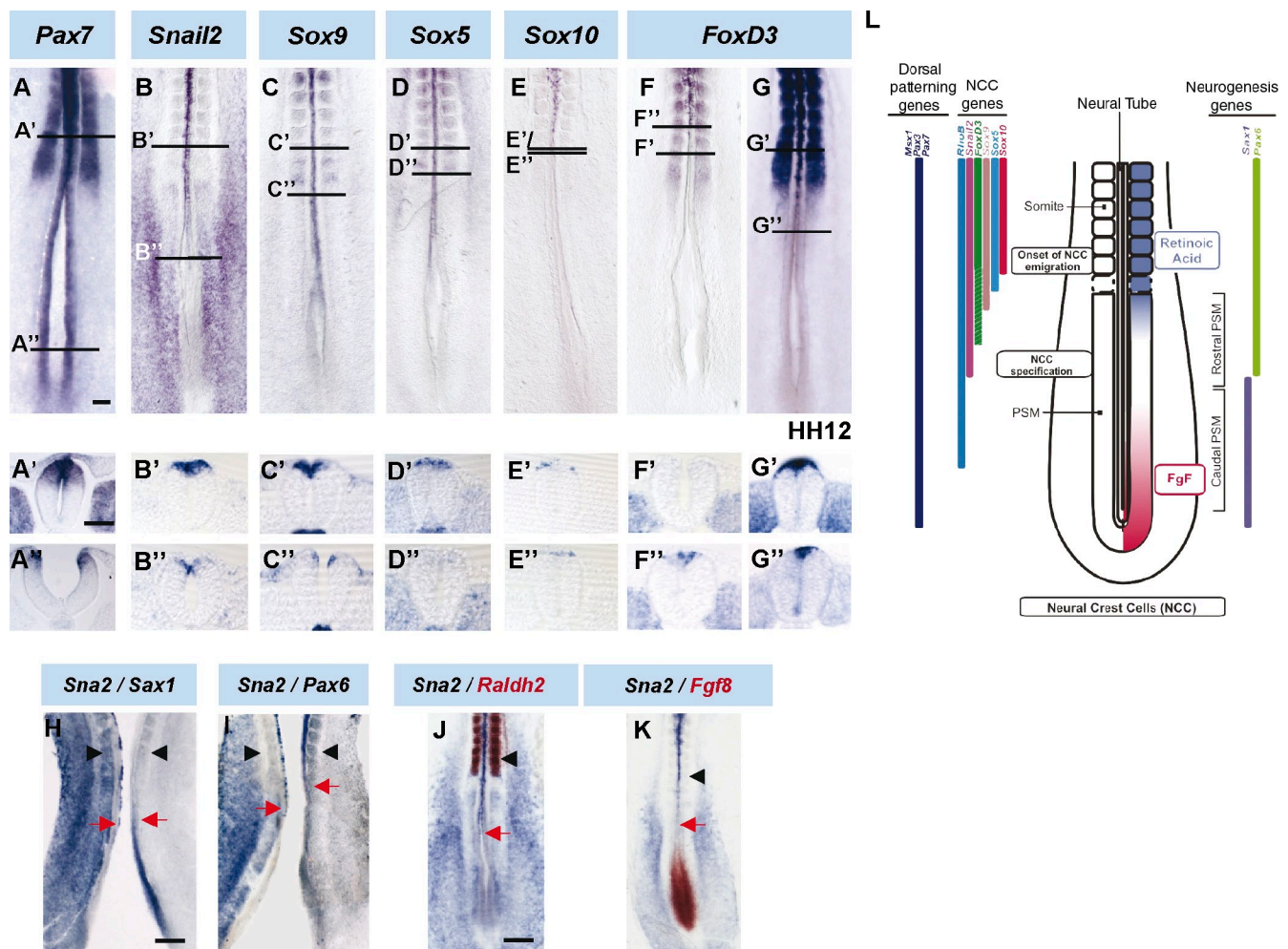


Figure 1. The onset of expression of NCC markers along the R-C axis coincides with FGF8 decline. (A–K) Gene expression analysis of stages HH10 (A–F and H–K) and 12 (G) chicken embryos. Transverse sections at the last formed somite level (A'–G') or at the onset of gene expression in the dorsal neural tube (A''–G''); indicated by horizontal lines in the corresponding figures). (H and I) *Snail2* (H and I, left), *Sax1* (H, right), or *Pax6* (I, right) expression in bilaterally dissected embryos. (J and K) Double in situ hybridization for *Snail2* (purple), *Raldh2* (J, red), and *Fgf8* (K, red). Black arrowheads point to the last formed somite, and red arrows point to the border of gene expression. (L) Schema of the approximate axial level of different gene expression in relation to NCC development. Bars: (A, for A–G) 100 μ m; (A', for A'–G' and A''–G'') 50 μ m; (H, for H and I) 200 μ m; (J, for J and K) 300 μ m.

($n = 13/13$; Fig. 2 B; Minowada et al., 1999) in comparison with control DMSO-treated embryos ($n = 0/12$; Fig. 2 A). After a 4-h culture with SU5402, *Snail2* expression was enhanced in the dorsal part of the neural tube and was prematurely initiated at the level of Hensen's node ($n = 11/12$; Fig. 2 F) in comparison with control embryos ($n = 4/18$; Fig. 2 E). A similar premature *Snail2* up-regulation was observed using the specific FGFR1 inhibitor PD173074 ($n = 7/7$; Fig. S1; Skaper et al., 2000) and was quantified using quantitative RT-PCR as a twofold increase in relative *Snail2* mRNA levels in PD173074 with respect to DMSO-treated samples in the neural tube at the level of the caudal PSM (2.06 [1.77–2.39]; Fig. S1). As a control, a similar quantitative RT-PCR analysis showed a threefold decrease in *Sprouty* relative mRNA levels in PD173074 with respect to DMSO-treated samples (0.31 \pm 0.16; Fig. S1). PD173074 and SU5402 not only inhibit FGFR signaling but also target VEGF receptors (VEGFRs; Mohammadi et al., 1997, 1998). To determine whether these effects are specifically mediated by FGFR signaling, we used a specific VEGFR inhibitor, KRN633

(Nakamura et al., 2004). This did not alter the onset of *Snail2* expression ($n = 12/15$; Fig. S2) in relation to control DMSO-treated embryos ($n = 13/15$; Fig. S2). However, FGFR1 inhibition either with PD173074 or SU5402 did not alter the expression of *FoxD3*, another NCC specifier ($n = 4$ and 7, respectively; Fig. S1 and not depicted), with respect to control embryos ($n = 9$). Together, these results indicate that FGF caudal gradient prevents the premature expression of the early NCC specifier *Snail2* in the caudal neural tube.

Activation of the tyrosine kinase FGFR can initiate transduction via several downstream pathways including MAPK and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K; Schönwasser et al., 1998). Both pathways have been involved in the transmission of FGF signaling during early stages of neural development (Ribisi et al., 2000; Stavridis et al., 2007), and dual phosphorylated MAPK has been specifically detected in the caudal FGF signaling domain (Lunn et al., 2007). We investigated the potential role of the MAPK kinase (MEK)–extracellular signal-regulated kinase (ERK) regulatory pathway in the control of NCC

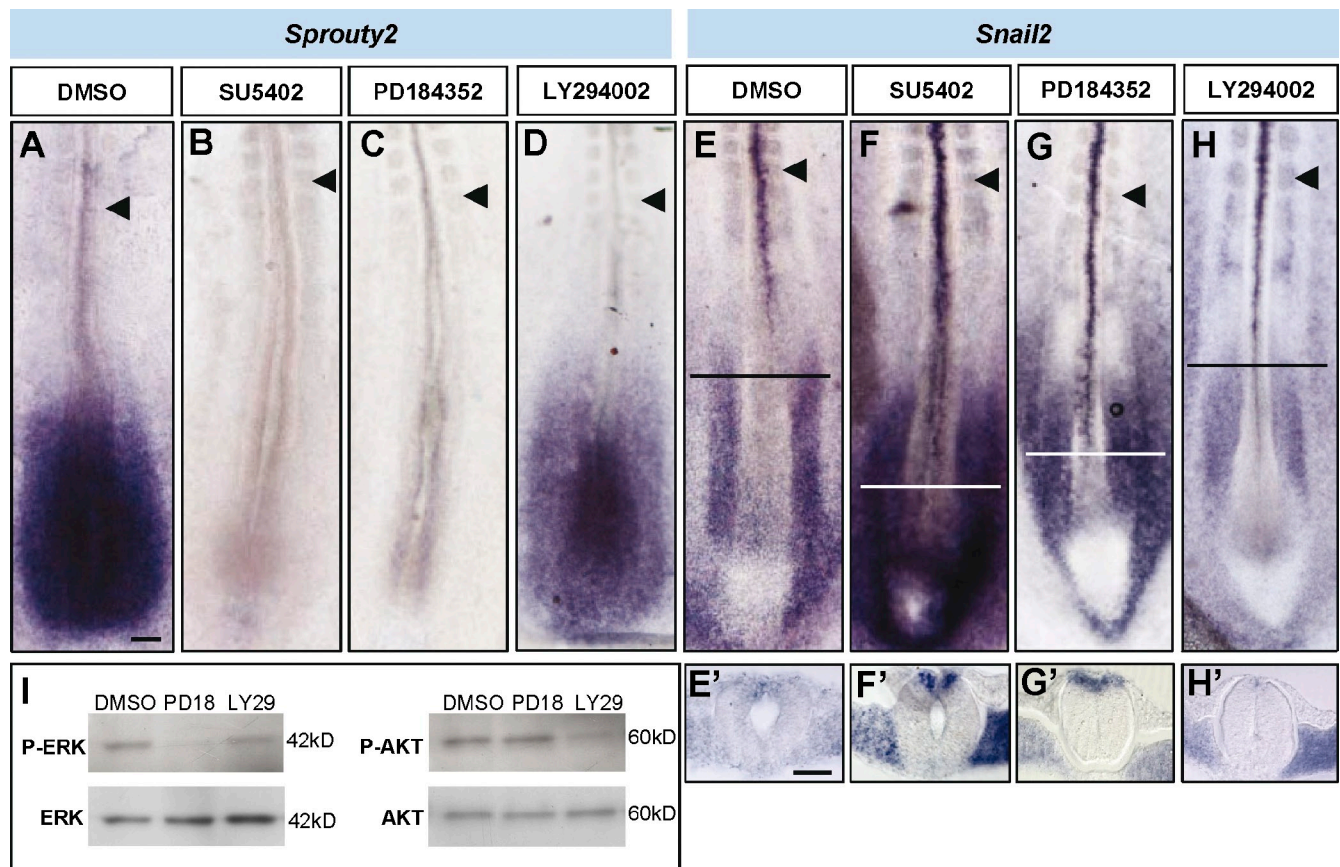


Figure 2. FGF signaling controls the onset of trunk NCC specification through the MAPK pathway. (A–H) Stage HH11 and 12 embryos cultured for 4 h in the presence of control (DMSO) or inhibitors for FGFR1 (SU5402), MEK (PD184352), or PI3K (LY294002) and analyzed for *Sprouty2* expression (A–D) and for *Snail2* (E–H). Black arrowheads point to the last formed somite. (E'–H') Transverse sections at the level are indicated by horizontal lines in the corresponding figures. (I) Western blot analysis from embryos treated with DMSO or the different inhibitors to detect levels of phosphorylated ERK (p-ERK) in comparison with total ERK and levels of phosphorylated AKT (p-AKT) in comparison with total AKT. Results shown are representative of at least three experiments. Bars: (A, for A–H) 100 μ m; (E', for E'–H') 50 μ m.

specification by selectively suppressing activation of MEK1 with the drug PD184352. In HH11 and 12 embryos cultured for 4 h, this drug effectively down-regulated the expression of a direct target of FGF signaling, *Sprouty2* ($n = 7/7$; Fig. 2 C), and reduced ERK1/2 phosphorylation (92% decreased in phospho-ERK/relative to total ERK; $n = 3$; Fig. 2 I) in comparison with DMSO-treated embryos ($n = 6$; Fig. 2, A and I). As with inhibition of FGFR1, blockage of the MAPK pathway leads to a premature and enhanced caudal expression of the NCC specifier *Snail2* ($n = 4/4$; Fig. 2 G). On the other hand, blockage of the PI3K pathway using the LY294002 treatment, which effectively reduces AKT phosphorylation (73% decreased in phospho-AKT/relative to total AKT; $n = 3$; Fig. 2 I), had very little effect on *Sprouty2* ($n = 1/7$; Fig. 2 D; Echevarria et al., 2005) and on *Snail2* mRNA expression ($n = 0/4$; Fig. 2 H). In conclusion, FGF signaling acting through the MAPK but not the PI3K pathway is required to prevent premature *Snail2* expression in NCCs and, consequently, to delay NCC specification.

The FGF signaling pathway controls the initiation of trunk NCC emigration

Premature specification of NCCs could lead to premature emigration at axial levels previous to somite formation. In the

aforementioned experiments, NCCs from embryos incubated with FGFR1 inhibitors for 4 h that prematurely expressed *Snail2* were not able to emigrate, as assessed by the expression of *Sox10* ($n = 9$; Fig. S1 and not depicted). To better test the consequence on NCC emigration, we examined the effect of blocking FGF signaling for longer periods of time using a dominant-negative FGFR1-EYFP protein (dn-FGFR1-EYFP; Yang et al., 2002) introduced into the right caudal hemitube at HH10 and 11. 18–20 h after electroporation, this construct effectively blocked the expression of FGF signaling targets such as *Sprouty2* ($n = 7/9$; Fig. S3; Minowada et al., 1999) and induced *Pax6* expression ($n = 5/6$; Fig. S3; Bertrand et al., 2000) in the neural tube in comparison with control pCIG embryos ($n = 6$ and $4/5$, respectively; Fig. S3). Remarkably, dorsal neural progenitors expressing the dn-FGFR1-EYFP protein prematurely activated *Snail2* ($n = 4/4$; not depicted) and *Sox10* expression and exited the neural tube ($n = 9/10$; Fig. 3 B, arrowhead) in comparison with the control side or with cells electroporated with a control EGFP ($n = 7$; Fig. 3 A). Moreover, the progressive disruption of the basal lamina, identified by Laminin expression (Martins-Green and Erickson, 1987), was also more advanced in the side where FGF signaling had been blocked ($n = 5/7$; Fig. 3 F) with respect to the control side or control embryos ($n = 7$; Fig. 3 C).

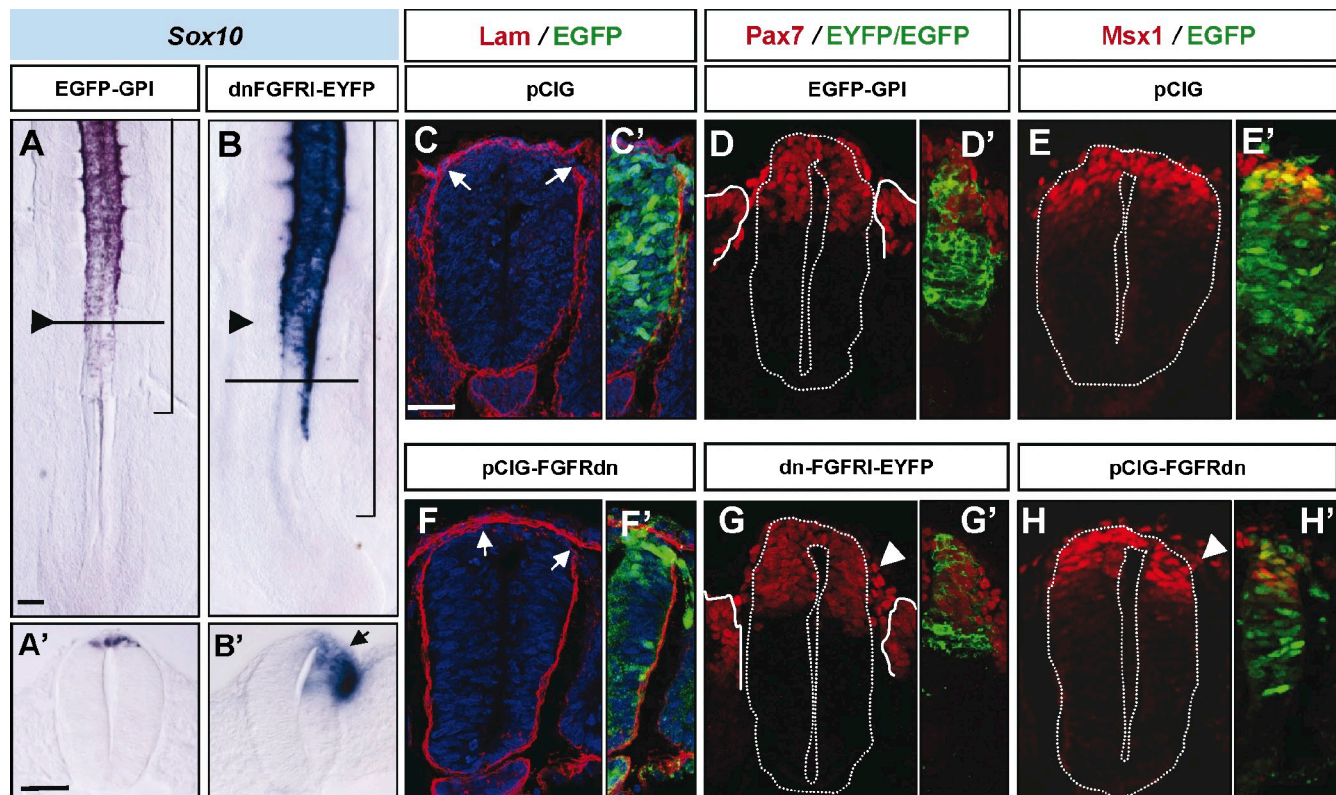


Figure 3. Blockage of the FGF signaling pathway promotes NCC premature emigration. (A–H) Stage HH11–13 embryos electroporated on the right neural hemitube with control membrane EGFP (EGFP-GPI), a control nuclear EGFP (pCIG), a dominant-negative truncated version of FGFR1 fused to EYFP (dn-FGFR1-EYFP), or a dn-FGFR in pCIG (FGFRdn-pCIG) construct, as indicated, and analyzed 18–24 h later. (A and B) *Sox10* expression. Black arrowheads point to the last formed somite, and brackets indicate the electroporated area. (A' and B') Transverse sections at the level are indicated by horizontal lines in the corresponding figures. The black arrow points to *Sox10* expression in migratory NCCs. (C–H) Immunostaining in electroporated embryos showing in red Laminin (Lam; C and F), Pax7 (D and G), and Msx1 (E and H) expression. (C'–H') EGFP/EYFP expression in the electroporated hemitube. White arrows point to borders of neural tube basal lamina, and white arrowheads point to an excess of migratory NCCs. The white dotted lines outline the neural tube borders. Bars: [A, for A and B] 50 μ m; [A', for A' and B'] 40 μ m; [C, for C–H] 30 μ m.

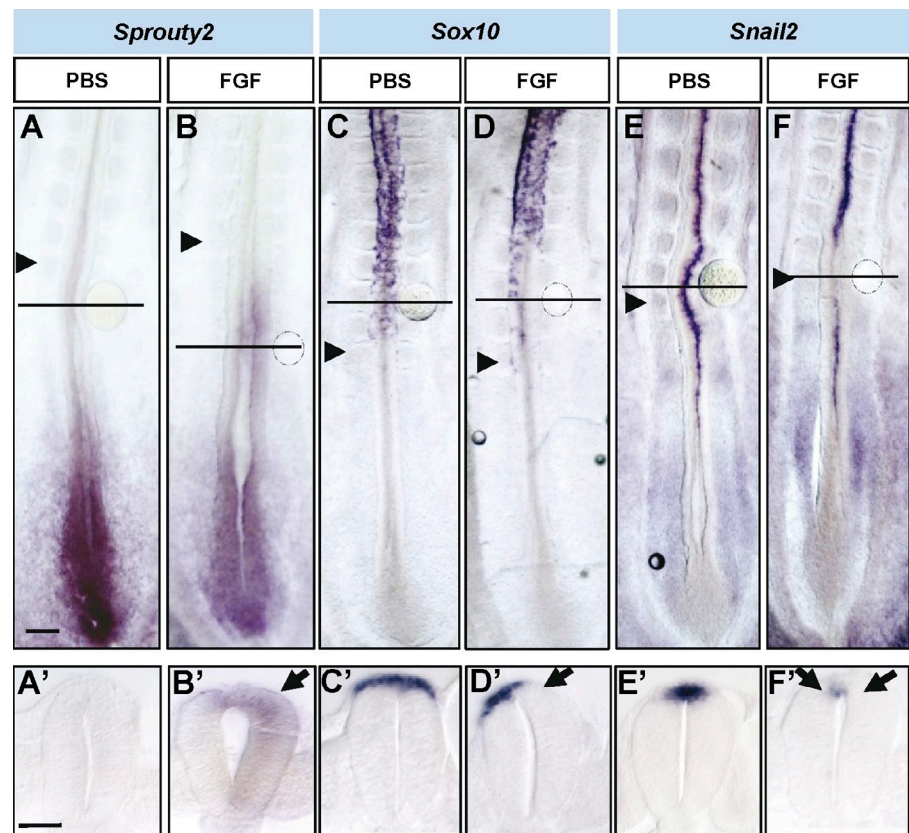
Migratory NCCs are a mixture of different population subtypes identified by differential gene expression (Del Barrio and Nieto, 2004; Krispin et al., 2010). To determine whether the NCCs delaminating prematurely upon FGF signaling blockage were specifically those expressing *Sox10*, we examined the effects on a whole cohort of NCC markers. After 18–20 h of dn-FGFR1 expression using a nuclear EGFP (pCIG-FGFRdn) as a reporter, there was an increase in the migratory NCC subpopulations expressing Pax7 ($n = 10/11$; $170 \pm 29\%$ with respect to the control side; Figs. 3 G and S4 G), Sox5 ($n = 13/13$; $159 \pm 24\%$ increase; Fig. S4, D and G), AP2 ($n = 7/7$; $149 \pm 13\%$ increase; Fig. S4, E and G), Pax3, *Snail2*, and *FoxD3* ($n = 9/9$, $4/4$, and $5/6$, respectively; not depicted) transcription factors in comparison with the control side and with pCIG-electroporated embryos ($n = 8$, 8 , 6 , 6 , 3 , and 8 , respectively; Figs. 3 D and S4, A–C).

Remarkably, not all the prematurely migrating NCCs were electroporated GFP⁺ cells (Fig. S4 D). To determine whether there was a non-cell-autonomous effect upon FGFR blockage, we analyzed the number of Sox5⁺ migratory cells that were either GFP⁺ or GFP[−] in relation to the number of migratory Sox5⁺ cells in the control nonelectroporated side (as a way of normalization to reduce axial level variations; Fig. S4 H). The relative number of double GFP⁺ Sox5⁺ migratory cells with respect to the total Sox5⁺ migratory cells in the control side was

significantly increased in FGFRdn embryos with respect to control pCIG ($68 \pm 28\%$ in FGFRdn and $42 \pm 15\%$ in pCIG; Fig. S4 H). Interestingly, the relative number of GFP[−] Sox5⁺ cells was also significantly increased in FGFRdn embryos with respect to control pCIG ($192 \pm 61\%$ in FGFRdn and $65 \pm 7\%$ in pCIG; Fig. S4 H). All these data suggest that the premature migration of the FGFRdn-GFP-electroporated cells was also promoting the exit of adjacent non-GFP NCCs, and, thus, the effect on FGFR blockage would be in part non-cell autonomous on NCCs. Moreover, although NCC markers such as *Sox10*, *Snail2*, and Sox5 were prematurely expressed (Fig. 3 B and not depicted) and more ventrally expressed (Sox10; Fig. 3 B'), expression of dorsal markers such as Pax7 and Msx1 was not affected in the neural tube at epithelial somite levels ($n = 6$ and 10 , respectively; Fig. 3, G and H). In conclusion, blocking FGF signaling in the neural tube adjacent to PSM promotes premature NCC specification and emigration from the neural tube.

To determine whether ectopically maintaining the FGF could prevent NCCs from delaminating, we placed FGF8/4-soaked beads in contact with the HH11 and 12 dorsal neural tube at a level in which NCCs have already been specified but before they start *Sox10* expression. As expected, 18 h later, FGF4/8 promoted expression of its direct target *Sprouty2* in the adjacent neuroepithelial cells in HH15–17 embryos (FGF8 $n = 3$

Figure 4. Ectopic FGF inhibits NCC specification and emigration. (A–F) Stage HH11 and 12 embryos were exposed to heparin-coated beads either with PBS (A, C, and E) or with FGF4 (B, D, and F) after 16–18 h in culture. In situ hybridization analysis of *Sprouty*, *Sox10*, and *Snail2* expression. Black arrowheads point to the last formed somite. (A'–F') Transverse sections through the region where the bead was located, indicated by horizontal lines in the corresponding figures. Black arrows point to ectopic expression in B' and to down-regulation of expression in D' and F'. Bars: (A, for A–F) 100 μ m; (A', for A'–F') 40 μ m.



and FGF4 $n = 4$; Fig. 4, A and B; Minowada et al., 1999). In contrast to NCCs exposed to control BSA (Fig. 4, C and E, $n = 3$ and 5, respectively), the presence of FGF4/8 drastically reduced *Sox10* (FGF4 $n = 3/4$ and FGF8 $n = 3$; Fig. 4 D) and *Snail2* (FGF4 $n = 4$ and FGF8 $n = 6$; Fig. 4 F) expression and blocked NCC emigration. These data indicate that FGF maintains dorsal neural tube cells uncommitted with respect to neural crest fate and that FGF signaling decrease is necessary to promote NCC specification and subsequent migration from the neural tube.

The timing of NCC emigration confers different migratory behavior

In the trunk region of avian embryos, NCCs migrate in a stereotypical manner, leading to a general ventral to dorsal order of derivative colonization beginning with sympathetic ganglia and, finally, melanocytes (Le Douarin and Kalcheim, 1999). The final localization of crest cells can be predicted from their relative ventrodorsal position within the premigratory domain or by their time of emigration (Henion and Weston, 1997; Krispin et al., 2010). However, it is also possible that distinct properties of the differentiated mesodermal cells that the NCCs encounter during migration influence their trajectories (Harris and Erickson, 2007).

To determine whether the NCCs prematurely forced to delaminate upon blockage of FGF signaling had alterations in their migratory behavior, we followed early NCC migration using wide-field real-time microscopy of trunk dorsal neural tubes in slice culture (Wilcock et al., 2007; Ahlstrom and Erickson, 2009). We used electroporation of H2B-RFP (nucleus)- and

EGFP-glycosylphosphatidylinositol (GPI; cell membrane)-expressing vectors into stage HH10 chick embryos to follow individual cells (Fig. 5, A and C). Using MetaMorph software, we first compared the behavior of the migratory NCCs during the initiation or first wave of migration at the level of dissociating somites (somites V–XII) in control EGFP-GPI embryos (Fig. 5 [A, B, and G] and Video 1) in relation to dn-FGFR1-EYFP-electroporated NCCs that started prematurely migrating adjacent to epithelial somites (somites I–IV; Fig. 5 J and Video 3). We observed a similar speed of migration ($16.2 \pm 1.8 \mu\text{m/h}$ with respect to $12.4 \pm 1 \mu\text{m/h}$; Fig. 5 E) and a similar migration straightness (distance covered/length of the trajectory; 0.28 ± 0.07 with respect to 0.15 ± 0.4 ; Fig. 5 F) of the two spatially different located populations. These results indicate that the prematurely migrating NCCs, upon FGF signaling blockage, at epithelial somite levels have a similar behavior to the first wave of migrating control NCCs facing dissociating somites.

Conversely, we next analyzed the behavior of dn-FGFR1-EYFP-expressing NCCs (Fig. 5 [C, D, and H] and Video 2) that were migrating next to dissociating somites in comparison with the first migrating NCCs expressing EGFP-GPI (Fig. 5 A). The mean speed of the migratory NCCs upon a 12-h period was higher in NCCs expressing dn-FGFR1-EYFP ($20.2 \pm 1.9 \mu\text{m/h}$; Fig. 5 E) with respect to control NCCs ($12.4 \pm 1 \mu\text{m/h}$; Fig. 5, B and E). Moreover, tracking NCC trajectories revealed that most dn-FGFR1-expressing NCCs showed a straight trajectory (Fig. 5 H) contrary to control NCCs that exhibited tortuous trajectories and forward and backward movements (straightness factor of 0.39 ± 0.1 with respect to 0.15 ± 0.03 ; Fig. 5, F and G).

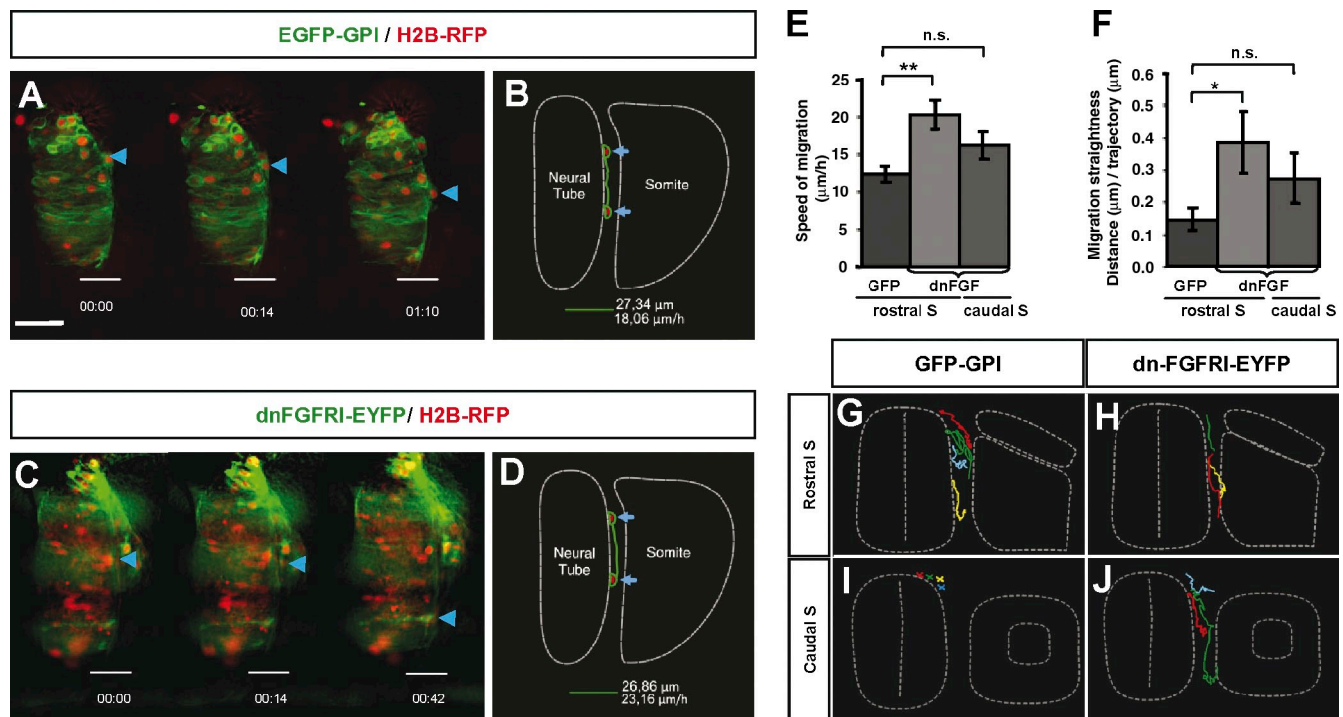


Figure 5. Analysis of migratory behavior in NCCs after FGF signaling blockade. (A–D) Chicken embryos at stages HH10 and 11 electroporated on the right neural hemitube with H2B-RFP (red) and with GFP-GPI or dn-FGFR1-EYFP (both green) and analyzed for imaging 14–16 h later. Selected frames taken from a control GFP-GPI (A)– or a dn-FGFR1-EYFP (C)–electroporated embryo at the level of differentiating somites (somite V). Blue arrows and arrowheads point to the same cell along the different frames. The trajectories of cells indicated in A and C are reflected in schemes B and D, respectively. (E and F) Quantitative analysis using MetaMorph software of the speed (E) and straightness (F) of NCC migration analyzed at the level of differentiated or epithelial somites. Error bars indicate the SD of $n = 10$. Statistical significance was examined by Student's t test. *, $P < 0.04$; **, $P < 0.003$. n.s., not significant. (G–J) A schematic representation of the trajectories followed by electroporated NCCs either with control EYFP (G and I) or dn-FGFR1-EYFP (H and J) of four representative embryos at the level of epithelial somites (I and J) or differentiating somites (G and H). Bar: (A, for A and C) 20 μm .

This higher speed and straightness of the more advanced delaminating NCCs expressing dn-FGFR1-EYFP could be a property of a more mature late-migrating NCC population in spite of both control and experimental cells facing the same somitic context. In summary, this analysis reveals distinct migratory properties according to the time of exit from the neural tube.

RA signaling is required to control the timing of NCC emigration

It has been shown that somites are required for the control of the onset of NCC emigration (Sela-Donenfeld and Kalcheim, 2000). However, the molecular nature of those signals emanating from the somites remains unknown. RA signaling is highly active in the neural tube at somitic levels, as revealed by in vivo reporter activity driven by RA response elements (RAREs) in mouse embryos (Rossant et al., 1991) and by the expression of a readout of RA signaling, *RAR- β* (the RARE promoter elements of which were used in the RARE-LacZ mouse) in chicken embryos (Olivera-Martinez and Storey, 2007). Moreover, the opposing gradients of FGF and RA pathways operate in concert as a switch that controls progressive neural and limb development (Diez del Corral and Storey, 2004).

To test whether RA could be involved in the control of NCC emigration in concert with FGF signaling, we performed neural tube electroporation of a truncated version of the human α -RA receptor (RAR [RAR- α]) that acts as a dominant-negative

form for the three RARs (RARdn–internal ribosome entry site (IRES)–GFP; Novitch et al., 2003). As expected, blocking RAR signaling at HH12 and 13 decreased the expression of Pax6 in neural precursors 24 h after electroporation (Fig. S5; Novitch et al., 2003). In HH12 and 13 embryos in which RA signaling was blocked where NCC emigration was starting, the number of cells expressing *Sox10* was reduced, and there was a dramatic delay in the emigration of *Sox10*⁺ NCCs ($n = 5/5$; Fig. 6 C) in comparison with the pCIG-electroporated cells ($n = 5/5$; Fig. 6 A). However, more caudally, the initiation of the expression of *Snail2* and *FoxD3*, early markers of NCC specification, was not affected ($n = 5$ and 6, respectively; Figs. 6 F and S5) in comparison with control pCIG-electroporated embryos ($n = 3$ and 8, respectively; Fig. 6 E), indicating that RA is required to establish the onset of NCC emigration independently of NCC specification.

Nevertheless, in HH11–13 embryos electroporated at the level of ongoing NCC migration (somites V–X), RA signaling blockade did not affect the EMT of *Sox10*-expressing NCCs ($n = 4$; Fig. 6 B) compared with the control ($n = 6$; Fig. 6 A). Similarly, blocking RA signaling did not alter the EMT of AP2⁺ NCCs in comparison with control ($n = 6$; Fig. S5). These data indicate that RA signaling is required to establish the onset but not the maintenance of NCC emigration.

To determine whether RA signaling was not only necessary but sufficient to control NCC emigration, we used a

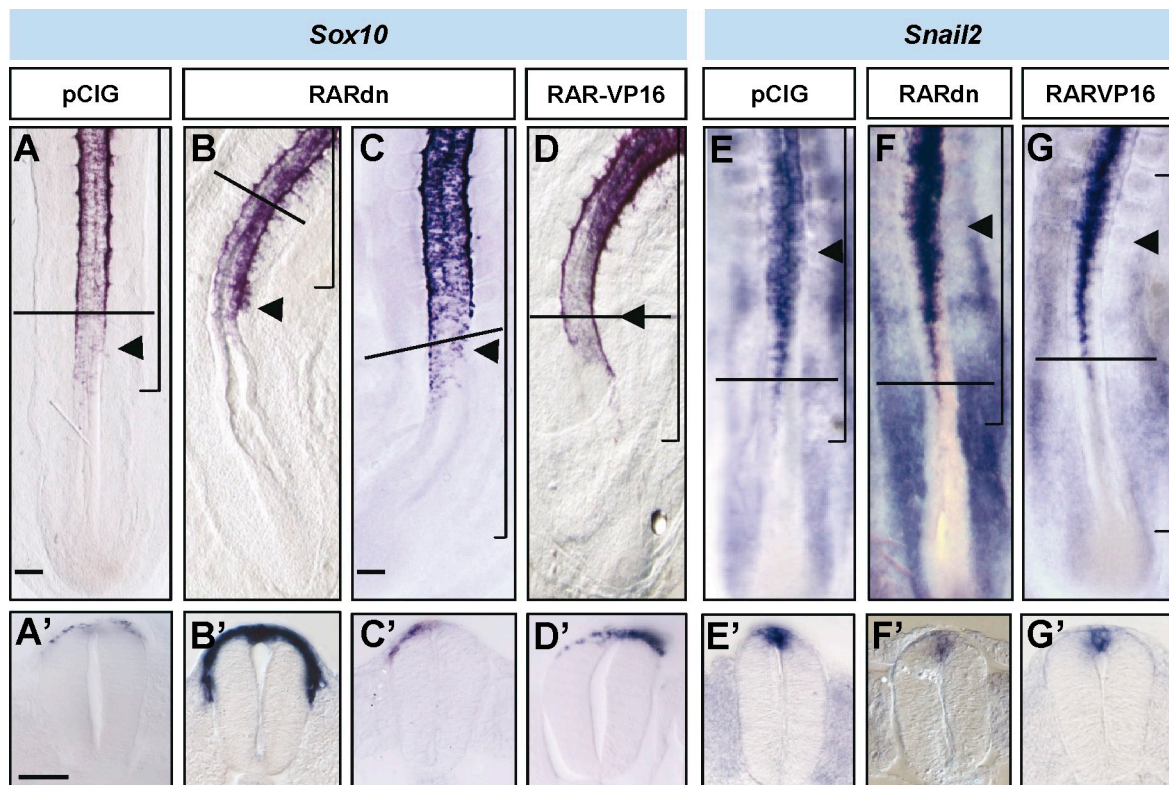


Figure 6. RA signaling is required at the neural tube to control the timing of NCC emigration. Chicken embryos at stages HH11–13 electroporated on the right neural hemitube with control pCX-IRES-GFP construct (pCIG), a dominant-negative truncated version of RAR- α (pCIG-RARdn), or a constitutively active form of RAR- α (RAR-VP16) and analyzed 18–24 h later. In situ hybridization of *Sox10* (A–D) and *Snail2* expression (E–G). Black arrowheads point to the last formed somites, and brackets indicate the electroporated area. (A'–G') Transversal sections at the level are indicated by horizontal lines in the corresponding figures. Bars: (A, for A, B, and D) 100 μ m; (C, for C and E–G) 80 μ m; (A', for A'–G') 45 μ m.

constitutively active form of RAR- α fused to the transcriptional activator domain of VP16 (VP16-RAR; Novitch et al., 2003). This construct activates RA target genes in a ligand-independent manner (Castro et al., 1999). VP16-RAR-electroporated neuroepithelial cells at the rostral PSM level delaminated prematurely from the dorsal neural tube in comparison with control embryos, as assessed by *Sox10* expression ($n = 5/7$; control $n = 6$; Fig. 6 D). Moreover, the initiation of *Snail2* or *FoxD3* expression in the caudal neural tube was not affected ($n = 4$ and 7, respectively; control $n = 5$ and 8, respectively; Figs. 6 G and S5). In summary, RA signaling is both necessary and sufficient to set the right timing for NCC emigration.

Retinoid signaling is required for very early neural crest specification

Our results have shown that RA signaling is not required for NCC specification during neural tube elongation. However, in *Raldh2* mutants, the expression of early NCC markers is severely down-regulated (Ribes et al., 2009). To determine whether that was exclusive of mammalian embryos, we analyzed expression of neural crest markers in vitamin A-deficient (VAD) quails, which represent a retinoid-deficient state (Maden et al., 1996). In normal quails, *Snail2* expression starts in the dorsal neural tube next to mid-PSM (Fig. 7 A), whereas it is strongly reduced in VAD NCCs (Fig. 7 B). Similarly, in RA-deficient conditions, *Sox9* expression is clearly absent from the dorsal neural tube

at the rostral PSM level (Fig. 7 D) in comparison with normal embryos (Fig. 7 C). To determine how early RA signaling is required for NCC specification, *Pax7* expression, a key mediator of neural plate border specification (Basch et al., 2006), was examined. In VAD embryos, *Pax7* is absent at the neural plate border (Fig. 7 F) in comparison with normal quails (Fig. 7 E). As the VAD quails represent an early RA-deficient state, these findings suggest that RA signaling is required for the earliest steps in dorsal and NCC specification during gastrulation before the RA activity is restricted to the neural tube adjacent to rostral PSM and is not required for NCC specification during neural tube elongation.

FGF maintains *Noggin* gradient in the caudal neural tube

It has been reported that an R-C gradient of BMP signaling in the dorsal neural tube, generated by the graded expression of the BMP antagonist *Noggin*, is involved in determining the onset of NCC emigration (Sela-Donenfeld and Kalcheim, 1999). As the *Noggin* gradient is controlled by unknown signals coming from the mesoderm (Sela-Donenfeld and Kalcheim, 2000), we tested whether FGF and/or RA could be those signals. First, we determined whether FGF signaling was required for *Noggin* expression, as both coincide in the caudal neural tube (Figs. 1 K and 8 A). In cultured embryos at stages HH10 and 11 briefly exposed (4 h) to the FGFR1 inhibitor PD173074, *Noggin* expression in the neural tube

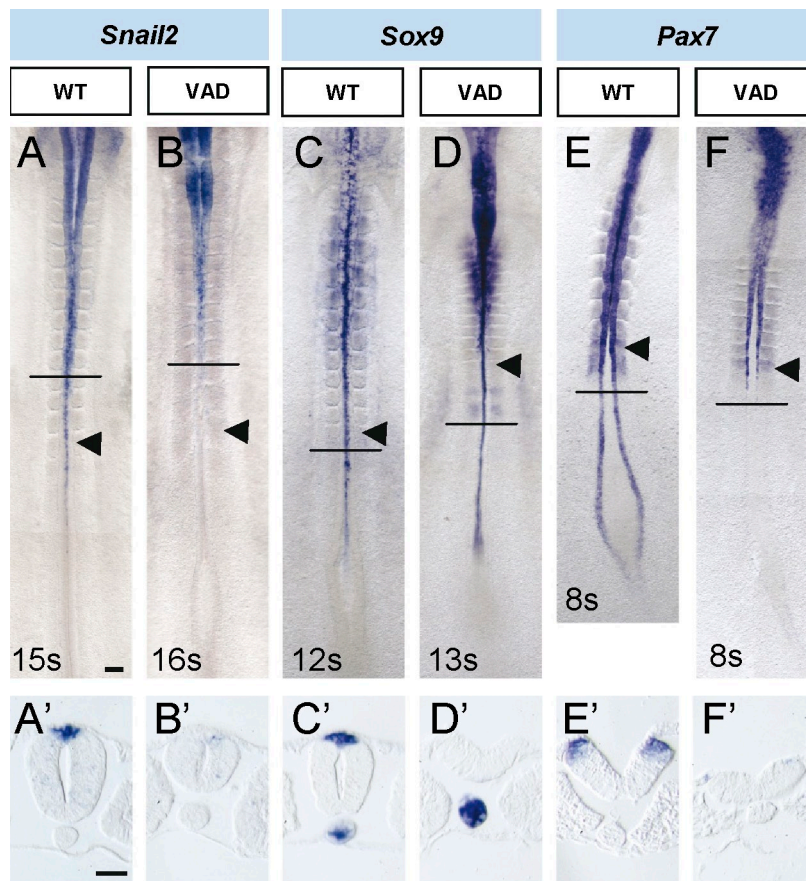


Figure 7. RA signaling is required for early NCC specification. (A–F) Comparison of gene expression patterns in the spinal cord in VAD quails and control stage matched quail embryos. (A'–F') Transverse sections at the level are indicated by horizontal lines in A–F. Black arrowheads point to the last formed somites. Bars: (A, for A–F) 100 μ m; (A', for A'–F') 50 μ m.

was not affected in comparison with control DMSO-treated embryos ($n = 8$ and 8 , respectively; Fig. 8, A and B). Similarly, after 18–20 h of dn-FGFR1 electroporation, *Noggin* and *BMP4* expression were not altered in relation to control GFP cells ($n = 7$ and 4 , respectively; Fig. 8 [C and D] and not depicted). However, exposing neural tube explants at the rostral PSM level to high doses of FGF4 promoted *Noggin* expression after just 4 h in culture ($n = 10$; Fig. 8 L) relative to BSA control explants ($n = 9$; Fig. 8 K), whereas *Snail2* expression (control $n = 4$; FGF4 $n = 3$; Fig. 8, G and H) was down-regulated, as previously observed with FGF4/8 beads (Fig. 4 F). *Sox10* expression was also down-regulated after 8 h, the time required for *Sox10* mRNA to be detected in control explants (control $n = 12$; FGF4 $n = 9$; Fig. 8, I and J). As a control, *Pax6* was down-regulated by FGF4 in neural tube explants at the somitic level (FGF4 $n = 16$; control $n = 15$; Fig. 8, E and F; Bertrand et al., 2000). Thus, the caudo-rostral FGF signaling gradient is sufficient but not necessary for *Noggin* expression.

To test whether RA was the signal responsible for repression of *Noggin* transcription, RARdn was electroporated in NCCs adjacent to rostral PSM. RARdn-electroporated NCCs exhibited similar levels of *Noggin* expression ($n = 4$; Fig. 8 D) to that of control ($n = 3$; Fig. 8 C). Similarly, in trunk explants at the caudal PSM level exposed for 4 h to the RAR agonist TTNPB, which induced high levels of *Pax6* (TTNPB $n = 10$; control $n = 9$; Fig. 8, M and N; Novitsch et al., 2003), *Noggin* expression was similar to that in control DMSO-treated explants 4 and 8 h after culture (control, 4 h, $n = 10$; TTNPB, 4 h, $n = 12$; control, 8 h, $n = 4$; TTNPB, 8 h, $n = 4$; Fig. 8, O and P).

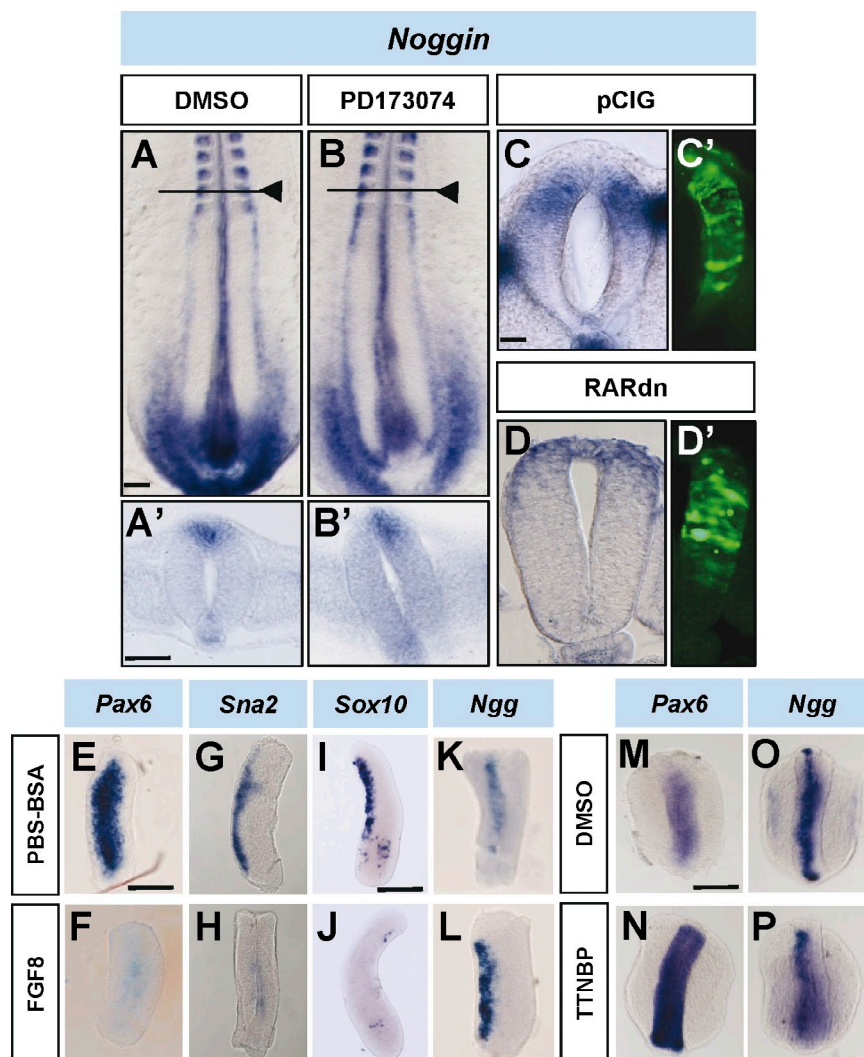
In summary, these results indicate that RA does not control NCC emigration through the down-regulation of *Noggin* gradient. Moreover, FGF signaling is sufficient but not necessary for *Noggin* expression, suggesting that the decrease in FGF signaling is required for *Noggin* down-regulation at somitic levels.

FGF and RA regulate NCC emigration in part through the control of *Wnt1* expression

It has been reported that Wnt ligands are necessary to control *Snail2* expression in NCCs in vivo and are sufficient to induce NCCs by in vitro assays (García-Castro et al., 2002). Moreover, blocking canonical Wnt signaling prevents NCC emigration (Burstyn-Cohen et al., 2004). However, apart from the control by BMP signaling (Burstyn-Cohen et al., 2004), the regulation of the Wnt pathway has not been extensively analyzed in the NCC during axial elongation. We looked to determine whether at NCC emigration FGF and RA signaling could be acting through the modulation of *Wnt1*.

In cultured embryos at stages HH12–14 briefly treated (4 h) with the FGFR1 inhibitor PD173074, the R–C gradient of *Wnt1* expression was prematurely initiated at more caudal levels ($n = 4/7$; Fig. 9 B) in comparison with control DMSO-treated embryos ($n = 10$; Fig. 9 A). Conversely, exposing neural tube explants from rostral PSM levels to FGF4 for 4 h in culture inhibited *Wnt1* expression (FGF4 $n = 6$; BSA $n = 8$; Fig. 9, C and D; described for longer incubation times in Olivera-Martínez

Figure 8. FGF maintains *Noggin* expression in the caudal neural tube. (A and B) Stage HH11 and 12 embryos cultured for 4 h in the presence of DMSO (control) or the FGFR1 inhibitor (PD173074) and analyzed for *Noggin* expression. Black arrowheads point to the last formed somites. (A' and B') Transversal sections of the respective embryos through the level are indicated by horizontal lines in the corresponding figures. (C and D) Transversal sections of embryos at stages HH11–13 electroporated with control pCIG or with pCIG-dnRAR (RARdn) and analyzed 18–24 h later for *Noggin* expression. (C' and D') EGFP in the electroporated area. (E–P) Neural tube explants at the level of rostral PSM (E–H, K, and L) or the entire PSM (I and J) and trunk explants (including neural tube and mesoderm; M–P) at the level of somites (M and N) or caudal PSM (O and P) cultured for 4 or 8 h (only for I and J) in the presence of the indicated medium and analyzed for the expression of the indicated mRNA. Bars: (A, for A and B) 90 μ m; (A', for A' and B') 50 μ m; (C, for C and D and C' and D') 35 μ m; (E, for E–H, K, and L) 100 μ m; (I, for I and J) 50 μ m; (M, for M–P) 85 μ m.



and Storey, 2007). In conclusion, FGF signaling levels control the initiation of *Wnt1* expression in the dorsal neural tube.

RA signaling activation in the neural tube adjacent to the somitic level coincides with the initiation of *Wnt1* expression (Figs. 1 K and 9 A). To determine whether RA signaling was required for the control of *Wnt1*, we examined HH10 and 11 VAD quail embryos (Fig. 9, G and H). Strikingly, in VAD embryos, expression of *Wnt1* and *Wnt3a* (Fig. 9, I and J; at older stages in Wilson et al., 2004) was strongly reduced, particularly at the spinal cord level in comparison with normal quail embryos. As this could be caused by the early NCC specification effect described in Fig. 7, we performed trunk explant experiments in chick embryos, where the NCCs have already been specified. Thus, in trunk explants at the rostral half PSM level, *Wnt1* expression was enhanced and caudally expanded after 4 h of exposure to the RAR agonist TTNBP in comparison with DMSO-treated explants ($n = 4$ and 4 , respectively; Fig. 9, E and F). However, this effect on *Wnt1* expression was not observed in trunk explants at the caudal PSM level exposed to TTNBP for 4 or 8 h in culture (DMSO, 4 h, $n = 6$; TTNBP, 4 h, $n = 6$; DMSO, 8 h, $n = 4$; TTNBP, 8 h, $n = 4$; unpublished data), where NCCs do not express specifiers like *Snail2* at the time of excision.

In summary, FGF signaling prevents the premature expression of *Wnt1*, whereas RA signaling triggers the initiation of *Wnt1* expression in the dorsal neural tube only at levels in which the NCCs are already specified. Given the short time required for its action in culture, FGF and RA could control the timing of NCC emigration through direct changes in *Wnt1* expression.

Discussion

During embryonic development, it is essential to coordinate the formation of adjacent tissues that maintain close functional relationships. In this work, we have established the mechanism that ensures the correct coordination between the formation of the central and peripheral nervous system in the trunk during the extension of the body axis. We have demonstrated that FGF and RA signaling set the correct timing for the crucial step of NCC EMT and emigration, which is necessary for the distribution of peripheral nervous system progenitors along the body axis.

Our work reinforces the idea that dorsal neuroepithelial progenitors in the caudal neural tube are maintained in an uncommitted state as a result of the presence of a strong FGF–MAPK signaling pathway. Therefore, the caudo-rostral gradient of FGF

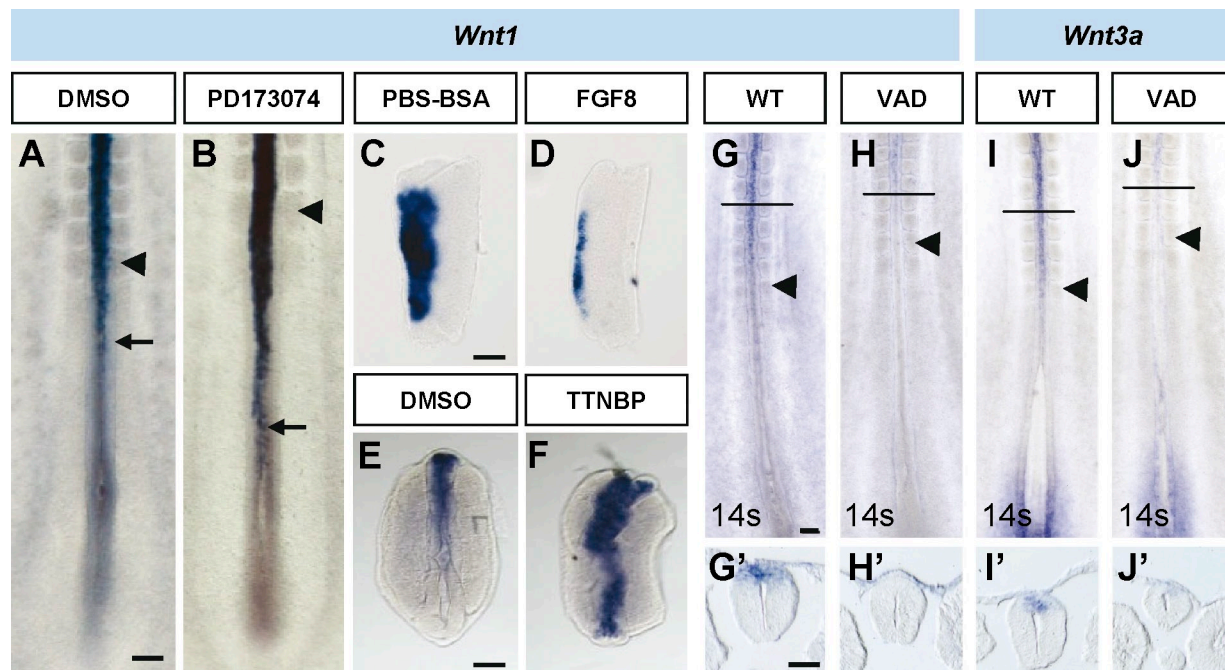


Figure 9. Onset of *Wnt1* expression is controlled by both FGF and RA signaling. (A and B) Stage HH11 and 12 embryos cultured for 4 h in the presence of DMSO (control) or FGFR1 inhibitor (PD173074) and analyzed for the expression of *Wnt1*. Arrows point to the onset of expression in the neural tube. (C–F) Explants of neural tube adjacent to rostral PSM (C and D) or whole trunk (including neural tube and mesoderm; E and F) cultured for 4 h in the presence of PBS-BSA (C) or DMSO (E) as a control, FGF8 (D), or the RA agonist TTNBP (F) and analyzed for *Wnt1* expression. (G–J) Comparison of *Wnt1* (G and H) and *Wnt3a* (I and J) expression in VAD quails and control stage matched quail embryos (wild type [WT]). (G'–J') Transverse sections at the level are indicated by horizontal lines in G–J. Black arrowheads point to the last formed somites. Bars: (A, for A and B) 160 μm; (C, for C and D) 50 μm; (E, for E and F) 42 μm; (G, for G–J) 100 μm; (G', for G'–J') 50 μm.

prevents the initiation of the neurogenesis program, the onset of the ventral patterning system (Diez del Corral et al., 2003), and also the onset of trunk NCC specification (Figs. 2, S1, and S2). Thus, in the elongating neural tube, as the dorsal neuroepithelial progenitors are progressively exposed to decreasing FGF signaling levels, they initiate the expression of neural crest specifier genes *Snail2* and *FoxD3*. In our experiments, forcing a reduction in FGF signaling allows neuroepithelial cells to prematurely initiate (just after 4 h) the expression of both the early NCC specifier *Snail2* at caudal levels and, more rostrally, the expression of *Wnt1* (signal required for NCC emigration; García-Castro et al., 2002; Burstyn-Cohen et al., 2004). However, only later on, when those prematurely *Snail2*-expressing NCCs initiate the expression of *FoxD3*, *Sox5*, and finally *Sox10* (after 14 h of FGF signaling blockage; Fig. 3), would they prematurely start EMT from the neural tube at midrostral PSM levels. Essentially, FGF signaling is primarily responsible for the control of the initiation of NCC specification in the trunk, and, as a consequence of that, it controls the timing of EMT and emigration. Furthermore, FGF blockage of NCC emigration is mediated in part by maintaining high levels of *Noggin* and low levels of *Wnt1* in the caudal neural tube (Fig. 10).

Although BMP signaling controls the expression of cytoskeletal components involved in EMT such as *Cadherin6B* (Park and Gumbiner, 2010) and *RhoB* (Liu and Jessell, 1998), altering BMP activity does not change *Snail2* expression and does not affect NCC specification (Sela-Donenfeld and Kalcheim, 1999). Given that most of the NCC specification studies done in

Xenopus embryos concern the cephalic NCCs (Monsoro-Burq et al., 2003; Hong and Saint-Jeannet, 2007), our work shows that the FGF pathway is, so far, the only signaling pathway clearly controlling the onset of NCC specification at the trunk level. This FGF function could be another example of a general FGF role in controlling the onset of differentiation of all cell types, as they are generated at the tail end.

Our study also points out the relevance of controlling *Snail2* expression to initiate NCC specification. Not only is *Snail2* expression ectopically activated just after 4 h of FGF signaling blockage in comparison with *FoxD3*, which remained unchanged, but *Snail2* is also one of the earliest NCC specifier genes being expressed during trunk NCC formation (Fig. 1; this study) and also during the caudal-most NCC development (caudal vertebrae level) in which *Snail2* expression also precedes that of *Sox9* and *FoxD3* (Osório et al., 2009). The regulation of *Snail* gene expression by FGF seems to be context dependent during development. Although *Snail1* is induced by FGF8 in the lateral mesoderm (Boettger et al., 1999) and primitive streak (Ciruna and Rossant, 2001) and by FGF3 in bone development (de Frutos et al., 2007), it is repressed by FGF in the somites (Boettger et al., 1999), and *Snail2* is repressed in the dorsal neural tube (this study). Furthermore, controlling the right levels of FGF signaling is essential to modulate *Snail* gene expression. In *Xenopus* embryos, FGF signaling is involved in cephalic NCC induction (Monsoro-Burq et al., 2003). However, an excess of FGF signaling inhibits *Snail2* expression and NCC formation (Hong and Saint-Jeannet, 2007).

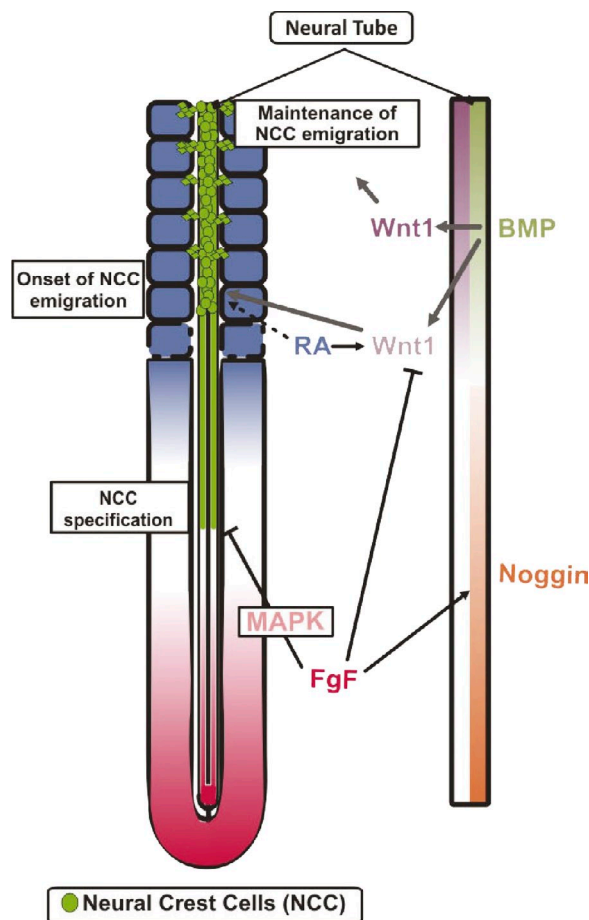


Figure 10. **Signaling pathways involved in the control of NCC specification and emigration during trunk elongation.** The FGF signaling (pink), acting through the MAPK pathway, prevents the onset of NCC (green) specification in the caudal neural tube and, through the regulation of *Wnt1* onset of expression (pale red) and *Noggin* (orange) expression, controls the initiation of NCC emigration by modulating NCC genes (dashed arrow) or by controlling the onset of *Wnt1* expression. The BMP signaling gradient (pale green) promotes the onset and maintenance of NCC emigration through the control of *Wnt1* expression (gray lines; data from Burstyn-Cohen et al., 2004).

In contrast to FGF signaling acting at the caudal level, RA signaling is operating at somitic levels. Our data demonstrate that, at least during trunk elongation, RA signaling is not required for the control of NCC specification but regulates the timing of NCC emigration. Thus, the onset of *Snail2* expression is not affected by changes in RA signaling, but the onset of emigration of *Sox10*⁺ NCC cells at the midrostral PSM level can be modulated by changing RA signaling.

BMP activity regulates emigration of already specified NCCs (Sela-Donenfeld and Kalcheim, 1999) through the control of *Wnt1* expression (Burstyn-Cohen et al., 2004). RA activity controls emigration modulating, together with FGF signaling, the onset of *Wnt1* expression in the dorsal neural tube at rostral PSM levels (Fig. 10). Thus, our experiments have established that both FGF and RA signaling act as upstream pathways to the BMP/*Noggin*-*Wnt1* signaling cascade to set the right timing for NCC emigration to keep it in register with somite formation. However, the effect of RA on emigration only occurs at

rostral PSM and the last-formed somite level. More rostrally, inhibiting RA signaling does not affect ongoing emigration probably because BMP signaling is sufficient to maintain the process (Burstyn-Cohen et al., 2004). Conversely, at most, caudal neural tube level changes in FGF or RA signaling are not sufficient to induce premature *Wnt1* expression (Fig. 9), and, consequently, NCCs cannot delaminate from the most caudal part of the neural tube. This time, the absence of BMP signaling at caudal levels could be responsible for the impossibility of emigration.

The consequences of altering the timing of migration could be crucial for the development of the NCC derivatives. It has recently been shown that the final localization of crest cells can be predicted by their time of emigration (Krispin et al., 2010). Here, we have demonstrated that the different NCC populations do differ in their migratory behavior, as the first migratory cells (including those prematurely forced to migrate in our experiments; Fig. 5) move at lower speed and follow more tortuous paths than later-migrating NCCs. It remains to be seen whether changes in migratory behavior adopted in an inappropriate context (nondifferentiated somites) will have consequences in the final differentiation of the NCCs.

In summary, our data show that there is a limited time window during which the onset of the NCC emigration can be modulated once those cells have acquired the expression of the essential gene network of the NCC specification program. That window coincides with the region where FGF and RA gradients collide, and it is required to keep the emergence of peripheral nervous system progenitors in register with the progressive programs of spinal cord neurogenesis and somite development during trunk axial elongation.

Materials and methods

In situ hybridization

Chicken eggs were incubated at 38°C in an atmosphere of 70% humidity. Embryos were staged according to HH. Embryos were fixed overnight at 4°C with 4% PFA in PBS, rinsed, and processed for whole-mount in situ hybridization. In brief, embryos were treated with 1% H₂O₂ and 10 µg/ml proteinase K, refixed in 4% PFA, and then hybridized overnight at 57°C in 5× SSC buffer containing 50% formamide with digoxigenin- or fluorescein-labeled riboprobes as previously described (Martinez-Morales et al., 2010). The chick *Pax7*, *Snail2*, *Sox5*, *Sox10*, *FoxD3*, *Sox9*, *Sax1*, *Pax6*, *Raldh2*, *FGF8*, *Sprouty2*, *Noggin*, and *Wnt1* riboprobes have been previously described (Cheung and Briscoe, 2003; Diez del Corral et al., 2003; Burstyn-Cohen et al., 2004; Perez-Alcala et al., 2004). Chicken *Pax3* and *Pax7* cDNAs were provided by H. Nakamura (Tokohu University, Sendai, Japan). Chicken *VE-cadherin* was cloned using primers 5'-TCCTTCATCTCTCA-TCCGTG-3' (forward) and 5'-TGCCGCTCCAAACCTTACTTCC-3' (reverse) following recommendations from C.A. Roselló (Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid, Spain). 4–15 embryos were analyzed for each experimental condition. The probe hybridization was detected with AP coupled with either antidigoxigenin Fab fragments (Roche) or antifluorescein Fab fragment (Roche) and developed with nitro blue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate p-toluidine salt (BCIP) or 2-[4-iodophenyl]-5-[4-nitrophenyl]-3-phenyltetrazolium chloride/BCIP. Hybridized embryos were postfixed in 4% PFA and vibratome sectioned, and immunostaining was performed as described in the Immunohistochemistry section to visualize GFP⁺-electroporated cells.

Embryo and explant culture

Chicken embryos at stages HH11 and 12 were cultured onto collagen beds (prepared as a mixture containing 2.9 mg/ml collagen rat tail [BD], 1× L15 [Invitrogen], and 0.6% NaHCO₃ to achieve proper polymerization)

covered with Opti-MEM medium (Invitrogen) supplemented with 5% FBS serum, 2 mM glutamine, and 50 µg/ml gentamycin. Inhibitors were added to the culture medium (100 µM SU5402, 100 µM PD184352, 10 µM PD173074, 100 µM LY294002, 10 µM KR633, or DMSO vehicle). Embryos were cultured for 4 h at 37°C and 5% CO₂ before fixation in 4% (weight/volume) PFA in PBS overnight at 4°C. For FGF treatment, chicken embryos at stages HH10 and 11 were put in early chick culture (Chapman et al., 2001) before being grafted with heparin-coated beads soaked in PBS, FGF8b (50 µg/ml), or FGF4 (50 or 500 µg/ml; an inducer of MAPK-like FGF8; Sigma-Aldrich; Diez del Corral et al., 2002; Casanova et al., 2011). Both FGF4 and FGF8 provoked a decrease in the expression of *Snail2* and *Sox10*, but, obviously, the effect was more extensive with the highest concentration, affecting a larger area of premigratory NCCs (Casanova et al., 2011). After incubation at 38°C for 18–20 h, embryos were either processed for whole-mount in situ hybridization or dissected to obtain explants for quantitative RT-PCR. Retinoid-deficient quail embryos were a gift from E. Gale and M. Maden (Medical Research Council Centre for Developmental Neurobiology, King's College London, London, England, UK), and normal and deficient quail embryos were fixed and processed together for in situ hybridization (Diez del Corral et al., 2003).

Explants were dissected from HH9–13 embryos treated with trypsin to separate the neural tissue from the mesoderm when necessary (Diez del Corral et al., 2002). Explants were cultured in collagen beds and cultured covered in Opti-MEM medium as described above containing either BSA or 360 ng/ml FGF4 (both supplemented with 0.1 ng/µl heparin) or containing 10 µM KR633 (EMD), 0.1% DMSO, or 10 µM TNPB (EMD).

Western blot analysis

Western blot analysis was performed by an established method. 20-µg protein samples of each total cell extract were separated by 12% SDS-PAGE, transferred to a polyvinylidene fluoride Immobilon-P membrane (Millipore), and probed with antibodies anti-phospho-AKT (rabbit IgG; Cell Signaling Technology), anti-total AKT1/2 (H136; Santa Cruz Biotechnology, Inc.), anti-phospho-Erk1/2 (Thr202/Tyr204; Cell Signaling Technology), and anti-total Erk1/2 (Invitrogen). Signals were detected with HRP-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) using an ECL Advance Western Blotting Detection kit (GE Healthcare). Quantitative analysis was obtained with a densitometer (GS-800; Bio-Rad Laboratories). Results shown are representative of three or more experiments.

Quantitative real-time PCR

Explants of neural tube together with notochord at caudal PSM levels were dissected from embryos cultured for 4 h in the presence of DMSO or PD173074, and total RNA was isolated using the QuickGene RNA tissue kit SII (Fujifilm). cDNA was synthesized with SuperScript III DNA polymerase (Invitrogen) and random primers (Invitrogen). Real-time PCR was performed in a 7500 PCR System using Power SYBR green Master Mix (Applied Biosystems) and sequence-specific primers (Sigma-Aldrich). Sequences of *Snail2* primers were 5'-AGCCAACTACAGCAACTG-3' (forward) and 5'-TGATAGGGACTGGGTAGCTTC-3' (reverse), and sequences for *Sprouty2* primers were 5'-ATCATCTTCAGGGCCAGTTG-3' (forward) and 5'-TGCTCCCAAGTCTTCTTG-3' (reverse). 18S ribosomal RNA was used as a reference gene. *Sprouty2* levels were determined using the standard curve method, whereas *Snail2* levels were determined by the comparative Ct method following recommendations by Applied Biosystems based on validation experiments assessing whether efficiencies of target and reference are approximately equal. Three lots of 4–12 explants generated in three independent experiments were used. Each of these samples was retrotranscribed, the product was used as a template for each pair of primers in triplicate-well PCR reactions, and the PCR procedure was performed twice.

Constructs

Truncated chick FGFR1c (aa 1–425) fused to EYFP in a Clontech vector (pEYFP-N1) to generate dn-FGFR1-EYFP was provided by C. Weijer (University of Dundee, Dundee, Scotland, UK; Yang et al., 2002) and was also inserted into pCAGGS-IRES-nuclear EGFP (pCIG; Niwa et al., 1991) to generate pCIG-FGFRdn. The pCAGGS vector containing a membrane-tagged EGFP-GPI was used as a control. cDNAs encoding human RAR-α truncation mutant 403 (RAR403; Damm et al., 1993) and a VP16–RAR-α fusion (Castro et al., 1999) cloned into pCIG were provided by B. Novitsch (University of California, Los Angeles, CA; Novitsch et al., 2003). In this case, pCIG was used as a control vector.

Chick in ovo electroporation

Chick embryos were electroporated with purified plasmid DNA (QIAGEN) at 1–2 µg/µl in PBS with 50 ng/ml Fast green, as previously described

(Martinez-Morales et al., 2010). In brief, plasmid DNA was injected in the lumen of HH10 and 12 neural tubes, electrodes were placed on either side of the neural tube, and a train of electric pulses (five pulses at 14 V for 50 ms) was applied using an electroporator (TSS20; Intracel). Eggs were further incubated for 24–48 h and were assayed for EGFP expression in the neural tube. Subsequently, the embryos were fixed and processed for immunohistochemistry or in situ hybridization.

Immunohistochemistry

Embryos were fixed for 2–4 h at 4°C with 4% PFA in PBS, and they were immersed in 30% sucrose solution, embedded in optimal cutting temperature medium, and sectioned on a cryostat (CM1900; Leica). Alternatively, embryos were embedded in 5% agarose/10% saccharose and were sectioned in a vibratome (VT1000S; Leica). For immunohistochemistry, 10-µm cryostat or 40-µm vibratome agarose sections were permeabilized with 0.5% Triton X-100, blocked with 10% FBS, and incubated overnight at 4°C with the primary antibody. After washing, the cryostat sections were incubated for 1 h with secondary antibodies. Primary antibodies against the following proteins were used: Sox5 (Perez-Alcala et al., 2004), GFP (Invitrogen), and Laminin (Sigma-Aldrich). Monoclonal antibodies against Pax7, Msx1 (4G1), Pax6, AP2 (3B5), Pax3, and Snail (62.1E6) were all obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank (developed under the auspices of the National Institute of Child Health and Development and maintained by the University of Iowa). Alexa Fluor 488- and Cy3-conjugated anti-mouse or -rabbit secondary antibodies (Invitrogen) were used for detection, and, after staining, the sections were mounted in Citifluor mounting medium plus bisbenzimidazole and photographed using a true confocal scanner microscope (SP5; Leica).

Real-time imaging

Embryos at stages HH10 and 11 were electroporated with a concentration of 0.2 µg/µl H2B-RFP either with 1 µg/µl GFP-GPI or dn-FGFR1-EYFP. Embryos were incubated at 38°C for 18 h (for imaging at stages HH15 and 16). Slices of ~150 µm were taken from the trunk on stage HH16–18 chicken embryos (Wilcock et al., 2007) at the axial level of caudal, epithelial (somite I–IV), or rostral dissociated (somite V–XII) somites. Explants were cultured as described by Wilcock et al. (2007). In brief, slices of ~150 µm were taken with a microknife, embedded in rat tail collagen type I in coverslip-based Petri dishes (WillCo glass-bottom dish [Intracel] and GWst-3522 coated with poly-L-lysine [Sigma-Aldrich]), and cultured in Neurobasal medium without phenol red (Invitrogen) and supplemented with B-27 to a final 1× concentration with L-glutamine and gentamycin maintained at 37°C with 5% CO₂/air for ~4 h before imaging. Slices were imaged on a microscope workstation (DeltaVision Core; Applied Precision; Wilcock et al., 2007). The images were taken at least 20 µm past the cut surface of the slice and only where the ectoderm was intact. Images were captured using a 40× 1.30 NA objective lens with a xenon lamp (Applied Precision). Optical sections (exposure time = 50 ms, 512 × 512 pixels; bin = 2 × 2) were spaced by 2 µm and imaged at 7-min intervals for up to 24 h. The images obtained were deconvolved and projected using DeltaVision software (softWoRx; Applied Precision). MetaMorph software (Molecular Devices) was used to analyze the neural crest trajectory and the speed of migration. For each experimental condition, 10 cells were analyzed during a period of 4–12 h from at least four embryos.

Image acquisition and processing

Transmitted light images were acquired in an upright microscope (Eclipse 80i; Nikon) with Digital Sight D5-U1 or DXM1200F cameras using ACT-1 or ACT-2u software (Nikon). Whole embryos and explants were mounted in 50% PBS/50% glycerol and photographed with 10×/0.3 Plan Fluor, 20×/0.75 Plan Apo, or 20×/0.5 Plan Fluor objectives. Vibratome sections were mounted in 50% PBS/50% glycerol and photographed with a 40×/0.75 Plan Fluor objective. Fluorescence-labeled sections were mounted in Citifluor mounting medium plus bisbenzimidazole, and confocal images were taken using a true confocal scanner system (SP5; Leica) and a 40×/1.40 oil UV-corrected objective. Fluorochromes used were bisbenzimidazole (Invitrogen), Alexa Fluor 488 (Invitrogen), and Cy3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.). Images were assembled and corrected in contrast and brightness using Photoshop (CS3; Adobe).

Online supplemental material

Fig. S1 shows an analysis of NCC specification and emigration upon FGFR blockage using the PD173074 inhibitor. Fig. S2 shows that VEGFR activity inhibition does not alter *Snail2* expression in the neural tube. Fig. S3 shows that blockage of the FGF signaling pathway promotes premature Pax6 expression and prevents *Sprouty2* expression in the neural tube.

Fig. S4 shows that blockage of the FGF signaling pathway promotes premature NCC emigration of several populations. Fig. S5 shows that RA signaling is not required to maintain NCC emigration and does not control the onset of *FoxD3* expression in the neural tube. Video 1 shows the migration of NCCs electroporated with H2B-RFP and with control EGFP-GPI at the level of differentiating somites. Videos 2 and 3 show the migration of NCCs electroporated with H2B-RFP and with dn-FGFR1-EYFP at the level of differentiating (Video 2) and epithelial (Video 3) somites. Online supplemental material is available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.201011077/DC1>.

We thank P. Bovolenta for her support and suggestions throughout the project; M.A. Nieto for useful comments on the manuscript; A. Arias, I. Ocaña, and V. Barbero for excellent technical assistance; and E. Cisneros for advice on quantitative RT-PCR. VAD quails were provided by M. Maden and E. Gale.

This work was funded by Ministerio de Ciencia e Innovación grants to A.V. Morales (BFU2005-00762 and BFU2008-02963) and to R. Diez del Corral (BFU2005-02972) and by a Medical Research Council grant to K.G. Storey and I. Olivera-Martínez (G0600234). A.V. Morales was supported by the Ramón y Cajal Program, P.L. Martínez-Morales by a Ministerio de Ciencia e Innovación fellowship, and R.M. Das by a Wellcome Trust grant to K.G. Storey (083611/Z/07/Z).

Submitted: 15 November 2010

Accepted: 5 July 2011

References

- Ahlstrom, J.D., and C.A. Erickson. 2009. The neural crest epithelial-mesenchymal transition in 4D: a 'tail' of multiple non-obligatory cellular mechanisms. *Development*. 136:1801–1812. doi:10.1242/dev.034785
- Barrallo-Gimeno, A., J. Holzschuh, W. Driever, and E.W. Knapik. 2004. Neural crest survival and differentiation in zebrafish depends on *mont blanc/tap2a* gene function. *Development*. 131:1463–1477. doi:10.1242/dev.01033
- Basch, M.L., M. Bronner-Fraser, and M.I. García-Castro. 2006. Specification of the neural crest occurs during gastrulation and requires Pax7. *Nature*. 441:218–222. doi:10.1038/nature04684
- Bertrand, N., F. Médevielle, and F. Pituello. 2000. FGF signalling controls the timing of Pax6 activation in the neural tube. *Development*. 127:4837–4843.
- Boettger, T., L. Wittler, and M. Kessel. 1999. FGF8 functions in the specification of the right body side of the chick. *Curr. Biol.* 9:277–280. doi:10.1016/S0960-9822(99)80119-5
- Brewster, R., J. Lee, and A. Ruiz i Altaba. 1998. Gli/Zic factors pattern the neural plate by defining domains of cell differentiation. *Nature*. 393:579–583. doi:10.1038/31242
- Bronner-Fraser, M. 1986. Guidance of neural crest migration. Latex beads as probes of surface-substratum interactions. *Dev. Biol. (NY)*. 3:301–337.
- Burstyn-Cohen, T., J. Stanleigh, D. Sela-Donenfeld, and C. Kalcheim. 2004. Canonical Wnt activity regulates trunk neural crest delamination linking BMP/noggin signaling with G1/S transition. *Development*. 131:5327–5339. doi:10.1242/dev.01424
- Casanova, J.C., V. Uribe, C. Badia-Careaga, G. Giovinozzo, M. Torres, and J.J. Sanz-Ezquerro. 2011. Apical ectodermal ridge morphogenesis in limb development is controlled by Arid3b-mediated regulation of cell movements. *Development*. 138:1195–1205. doi:10.1242/dev.057570
- Castro, D.S., M. Arvidsson, M. Bondesson Bolin, and T. Perlmann. 1999. Activity of the Nurr1 carboxyl-terminal domain depends on cell type and integrity of the activation function 2. *J. Biol. Chem.* 274:37483–37490. doi:10.1074/jbc.274.52.37483
- Chapman, S.C., J. Collignon, G.C. Schoenwolf, and A. Lumsden. 2001. Improved method for chick whole-embryo culture using a filter paper carrier. *Dev. Dyn.* 220:284–289. doi:10.1002/1097-0177(20010301)220:3<284::AID-DVDY1102>3.0.CO;2-5
- Cheung, M., and J. Briscoe. 2003. Neural crest development is regulated by the transcription factor Sox9. *Development*. 130:5681–5693. doi:10.1242/dev.00808
- Ciruna, B., and J. Rossant. 2001. FGF signaling regulates mesoderm cell fate specification and morphogenetic movement at the primitive streak. *Dev. Cell*. 1:37–49. doi:10.1016/S1534-5807(01)00017-X
- Damm, K., R.A. Heyman, K. Umeson, and R.M. Evans. 1993. Functional inhibition of retinoic acid response by dominant negative retinoic acid receptor mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90:2989–2993. doi:10.1073/pnas.90.7.2989
- de Frutos, C.A., S. Vega, M. Manzanares, J.M. Flores, H. Huertas, M.L. Martínez-Frías, and M.A. Nieto. 2007. Snail1 is a transcriptional effector of FGFR3 signaling during chondrogenesis and achondroplasias. *Dev. Cell*. 13:872–883. doi:10.1016/j.devcel.2007.09.016
- Del Barrio, M.G., and M.A. Nieto. 2004. Relative expression of Slug, RhoB, and HNK-1 in the cranial neural crest of the early chicken embryo. *Dev. Dyn.* 229:136–139. doi:10.1002/dvdy.10456
- Diez del Corral, R., and K.G. Storey. 2004. Opposing FGF and retinoid pathways: a signalling switch that controls differentiation and patterning onset in the extending vertebrate body axis. *Bioessays*. 26:857–869. doi:10.1002/bies.20080
- Diez del Corral, R., D.N. Breitkreuz, and K.G. Storey. 2002. Onset of neuronal differentiation is regulated by paraxial mesoderm and requires attenuation of FGF signalling. *Development*. 129:1681–1691.
- Diez del Corral, R., I. Olivera-Martínez, A. Goriely, E. Gale, M. Maden, and K. Storey. 2003. Opposing FGF and retinoid pathways control ventral neural pattern, neuronal differentiation, and segmentation during body axis extension. *Neuron*. 40:65–79. doi:10.1016/S0896-6273(03)00565-8
- Dottori, M., M.K. Gross, P. Labosky, and M. Goulding. 2001. The winged-helix transcription factor Foxd3 suppresses interneuron differentiation and promotes neural crest cell fate. *Development*. 128:4127–4138.
- Dubrule, J., M.J. McGrew, and O. Pourquie. 2001. FGF signaling controls somite boundary position and regulates segmentation clock control of spatio-temporal Hox gene activation. *Cell*. 106:219–232. doi:10.1016/S0092-8674(01)00437-8
- Echevarría, D., S. Martínez, S. Marques, V. Lucas-Teixeira, and J.A. Belo. 2005. Mkp3 is a negative feedback modulator of Fgf8 signaling in the mammalian isthmus organizer. *Dev. Biol.* 277:114–128. doi:10.1016/j.ydbio.2004.09.011
- García-Castro, M.I., C. Marcelle, and M. Bronner-Fraser. 2002. Ectodermal Wnt function as a neural crest inducer. *Science*. 297:848–851.
- Goulding, M.D., G. Chalepakis, U. Deutsch, J.R. Erselius, and P. Gruss. 1991. Pax-3, a novel murine DNA binding protein expressed during early neurogenesis. *EMBO J.* 10:1135–1147.
- Harris, M.L., and C.A. Erickson. 2007. Lineage specification in neural crest cell pathfinding. *Dev. Dyn.* 236:1–19. doi:10.1002/dvdy.20919
- Henion, P.D., and J.A. Weston. 1997. Timing and pattern of cell fate restrictions in the neural crest lineage. *Development*. 124:4351–4359.
- Hong, C.S., and J.P. Saint-Jeannet. 2007. The activity of Pax3 and Zic1 regulates three distinct cell fates at the neural plate border. *Mol. Biol. Cell*. 18:2192–2202. doi:10.1091/mbc.E06-11-1047
- Kawakami, A., M. Kimura-Kawakami, T. Nomura, and H. Fujisawa. 1997. Distributions of PAX6 and PAX7 proteins suggest their involvement in both early and late phases of chick brain development. *Mech. Dev.* 66:119–130. doi:10.1016/S0925-4773(97)00097-X
- Khudyakov, J., and M. Bronner-Fraser. 2009. Comprehensive spatiotemporal analysis of early chick neural crest network genes. *Dev. Dyn.* 238:716–723. doi:10.1002/dvdy.21881
- Kos, R., M.V. Reedy, R.L. Johnson, and C.A. Erickson. 2001. The winged-helix transcription factor FoxD3 is important for establishing the neural crest lineage and repressing melanogenesis in avian embryos. *Development*. 128:1467–1479.
- Krispin, S., E. Nitzan, Y. Kassem, and C. Kalcheim. 2010. Evidence for a dynamic spatiotemporal fate map and early fate restrictions of premigratory avian neural crest. *Development*. 137:585–595. doi:10.1242/dev.041509
- Le Douarin, N.M., and C. Kalcheim. 1999. *The Neural Crest*. Second edition. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 445 pp.
- Liem, K.F. Jr., G. Tremml, H. Roelink, and T.M. Jessell. 1995. Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell*. 82:969–979. doi:10.1016/0092-8674(95)90276-7
- Liu, J.P., and T.M. Jessell. 1998. A role for rhoB in the delamination of neural crest cells from the dorsal neural tube. *Development*. 125:5055–5067.
- Loring, J.F., and C.A. Erickson. 1987. Neural crest cell migratory pathways in the trunk of the chick embryo. *Dev. Biol.* 121:220–236. doi:10.1016/0012-1606(87)90154-0
- Lunn, J.S., K.J. Fishwick, P.A. Halley, and K.G. Storey. 2007. A spatial and temporal map of FGF/Erk1/2 activity and response repertoires in the early chick embryo. *Dev. Biol.* 302:536–552. doi:10.1016/j.ydbio.2006.10.014
- Maden, M., E. Gale, I. Kostetskii, and M. Zile. 1996. Vitamin A-deficient quail embryos have half a hindbrain and other neural defects. *Curr. Biol.* 6:417–426. doi:10.1016/S0960-9822(02)00509-2
- Martínez-Morales, P.L., A.C. Quiroga, J.A. Barbas, and A.V. Morales. 2010. SOX5 controls cell cycle progression in neural progenitors by interfering with the WNT-beta-catenin pathway. *EMBO Rep.* 11:466–472. doi:10.1038/embor.2010.61
- Martins-Green, M., and C.A. Erickson. 1987. Basal lamina is not a barrier to neural crest cell emigration: documentation by TEM and by immunofluorescent and immunogold labelling. *Development*. 101:517–533.

- Minowada, G., L.A. Jarvis, C.L. Chi, A. Neubüser, X. Sun, N. Hacohen, M.A. Krasnow, and G.R. Martin. 1999. Vertebrate Sprouty genes are induced by FGF signaling and can cause chondrodysplasia when overexpressed. *Development*. 126:4465–4475.
- Mohammadi, M., G. McMahon, L. Sun, C. Tang, P. Hirth, B.K. Yeh, S.R. Hubbard, and J. Schlessinger. 1997. Structures of the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor in complex with inhibitors. *Science*. 276:955–960. doi:10.1126/science.276.5314.955
- Mohammadi, M., S. Froum, J.M. Hamby, M.C. Schroeder, R.L. Panek, G.H. Lu, A.V. Eliseenkova, D. Green, J. Schlessinger, and S.R. Hubbard. 1998. Crystal structure of an angiogenesis inhibitor bound to the FGF receptor tyrosine kinase domain. *EMBO J.* 17:5896–5904. doi:10.1093/emboj/17.20.5896
- Monsoro-Burq, A.H., R.B. Fletcher, and R.M. Harland. 2003. Neural crest induction by paraxial mesoderm in *Xenopus* embryos requires FGF signals. *Development*. 130:3111–3124. doi:10.1242/dev.00531
- Morales, A.V., J.A. Barbas, and M.A. Nieto. 2005. How to become neural crest: from segregation to delamination. *Semin. Cell Dev. Biol.* 16:655–662. doi:10.1016/j.semcdb.2005.06.003
- Nakamura, K., A. Yamamoto, M. Kamishihara, K. Takahashi, E. Taguchi, T. Miura, K. Kubo, M. Shibuya, and T. Isoe. 2004. KRN633: a selective inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor-2 tyrosine kinase that suppresses tumor angiogenesis and growth. *Mol. Cancer Ther.* 3:1639–1649.
- Nakata, K., T. Nagai, J. Aruga, and K. Mikoshiba. 1997. *Xenopus* Zic3, a primary regulator both in neural and neural crest development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94:11980–11985. doi:10.1073/pnas.94.22.11980
- Nieto, M.A., M.G. Sargent, D.G. Wilkinson, and J. Cooke. 1994. Control of cell behavior during vertebrate development by Slug, a zinc finger gene. *Science*. 264:835–839. doi:10.1126/science.7513443
- Niwa, H., K. Yamamura, and J. Miyazaki. 1991. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene*. 108:193–199. doi:10.1016/0378-1119(91)90434-D
- Novitsch, B.G., H. Wichterle, T.M. Jessell, and S. Sockanathan. 2003. A requirement for retinoic acid-mediated transcriptional activation in ventral neural patterning and motor neuron specification. *Neuron*. 40:81–95. doi:10.1016/j.neuron.2003.08.006
- Olivera-Martinez, I., and K.G. Storey. 2007. Wnt signals provide a timing mechanism for the FGF-retinoid differentiation switch during vertebrate body axis extension. *Development*. 134:2125–2135. doi:10.1242/dev.000216
- Osório, L., M.A. Teillet, and M. Catala. 2009. Role of noggin as an upstream signal in the lack of neuronal derivatives found in the avian caudal-most neural crest. *Development*. 136:1717–1726. doi:10.1242/dev.028373
- Paratore, C., D.E. Goerich, U. Suter, M. Wegner, and L. Sommer. 2001. Survival and glial fate acquisition of neural crest cells are regulated by an interplay between the transcription factor Sox10 and extrinsic combinatorial signaling. *Development*. 128:3949–3961.
- Park, K.S., and B.M. Gumbiner. 2010. Cadherin 6B induces BMP signaling and de-epithelialization during the epithelial mesenchymal transition of the neural crest. *Development*. 137:2691–2701. doi:10.1242/dev.050096
- Perez-Alcala, S., M.A. Nieto, and J.A. Barbas. 2004. LSox5 regulates RhoB expression in the neural tube and promotes generation of the neural crest. *Development*. 131:4455–4465. doi:10.1242/dev.01329
- Ribes, V., I. Le Roux, M. Rhinn, B. Schuhbaur, and P. Dollé. 2009. Early mouse caudal development relies on crosstalk between retinoic acid, Shh and Fgf signalling pathways. *Development*. 136:665–676. doi:10.1242/dev.016204
- Ribisi, S. Jr., F.V. Mariani, E. Amar, T.M. Lamb, D. Frank, and R.M. Harland. 2000. Ras-mediated FGF signaling is required for the formation of posterior but not anterior neural tissue in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* 227:183–196. doi:10.1006/dbio.2000.9889
- Rickmann, M., J.W. Fawcett, and R.J. Keynes. 1985. The migration of neural crest cells and the growth of motor axons through the rostral half of the chick somite. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 90:437–455.
- Rossant, J., R. Zirngibl, D. Cado, M. Shago, and V. Giguère. 1991. Expression of a retinoic acid response element-hsplaZ transgene defines specific domains of transcriptional activity during mouse embryogenesis. *Genes Dev.* 5:1333–1344. doi:10.1101/gad.5.8.1333
- Saint-Jeannet, J.P., X. He, H.E. Varmus, and I.B. Dawid. 1997. Regulation of dorsal fate in the neuraxis by Wnt-1 and Wnt-3a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94:13713–13718. doi:10.1073/pnas.94.25.13713
- Sauka-Spengler, T., and M. Bronner-Fraser. 2008. A gene regulatory network orchestrates neural crest formation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9:557–568. doi:10.1038/nrm2428
- Schönwasser, D.C., R.M. Marais, C.J. Marshall, and P.J. Parker. 1998. Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isotypes. *Mol. Cell. Biol.* 18:790–798.
- Sela-Donnenfeld, D., and C. Kalcheim. 1999. Regulation of the onset of neural crest migration by coordinated activity of BMP4 and Noggin in the dorsal neural tube. *Development*. 126:4749–4762.
- Sela-Donnenfeld, D., and C. Kalcheim. 2000. Inhibition of noggin expression in the dorsal neural tube by somitogenesis: a mechanism for coordinating the timing of neural crest emigration. *Development*. 127:4845–4854.
- Skaper, S.D., W.J. Kee, L. Facci, G. Macdonald, P. Doherty, and F.S. Walsh. 2000. The FGFR1 inhibitor PD 173074 selectively and potently antagonizes FGF-2 neurotrophic and neurotropic effects. *J. Neurochem.* 75:1520–1527. doi:10.1046/j.1471-4159.2000.0751520.x
- Stavridis, M.P., J.S. Lunn, B.J. Collins, and K.G. Storey. 2007. A discrete period of FGF-induced Erk1/2 signalling is required for vertebrate neural specification. *Development*. 134:2889–2894. doi:10.1242/dev.02858
- Stewart, R.A., B.L. Arduini, S. Berghmans, R.E. George, J.P. Kanki, P.D. Henion, and A.T. Look. 2006. Zebrafish foxd3 is selectively required for neural crest specification, migration and survival. *Dev. Biol.* 292:174–188. doi:10.1016/j.ydbio.2005.12.035
- Teillet, M.A., C. Kalcheim, and N.M. Le Douarin. 1987. Formation of the dorsal root ganglia in the avian embryo: segmental origin and migratory behavior of neural crest progenitor cells. *Dev. Biol.* 120:329–347. doi:10.1016/0012-1606(87)90236-3
- Tosney, K.W. 1978. The early migration of neural crest cells in the trunk region of the avian embryo: an electron microscopic study. *Dev. Biol.* 62:317–333. doi:10.1016/0012-1606(78)90219-1
- Villanueva, S., A. Glavic, P. Ruiz, and R. Mayor. 2002. Posteriorization by FGF, Wnt, and retinoic acid is required for neural crest induction. *Dev. Biol.* 241:289–301. doi:10.1006/dbio.2001.0485
- Wilcock, A.C., J.R. Swedlow, and K.G. Storey. 2007. Mitotic spindle orientation distinguishes stem cell and terminal modes of neuron production in the early spinal cord. *Development*. 134:1943–1954. doi:10.1242/dev.002519
- Wilson, L., E. Gale, D. Chambers, and M. Maden. 2004. Retinoic acid and the control of dorsoventral patterning in the avian spinal cord. *Dev. Biol.* 269:433–446. doi:10.1016/j.ydbio.2004.01.034
- Yang, X., D. Dormann, A.E. Münsterberg, and C.J. Weijer. 2002. Cell movement patterns during gastrulation in the chick are controlled by positive and negative chemotaxis mediated by FGF4 and FGF8. *Dev. Cell.* 3:425–437. doi:10.1016/S1534-5807(02)00256-3

Sox5 counteracts Wnt-promoted dorsal identity in the neural tube through the control of *Axin2* transcription

**Alejandra C. Quiroga ¹, C. Claus Stolt ², Siro Pérez-Alcalá ¹, Elisabeth Sock ²,
Julio A. Barbas ¹, Michael Wegner ² and Aixa V. Morales ^{1,*}**

¹Instituto Cajal, CSIC, Madrid, 28002, Spain.

²Institut für Biochemie, Universität Erlangen-Nürnberg, Erlangen, D-91054, Germany.

Short title: Sox5 controls dorsal identity

Key words: patterning / spinal cord / Sox transcription factors /Wnt signalling

Words (excluding references): 6,111

*Author for correspondence: E-mail: aixamoraless@cajal.csic.es

Tel: +34915854722; Fax: +34915854754

SUMMARY

During the development of the central nervous system, a vast number of different neurons and glial cells are generated from a small population of self-renewing progenitor cells. As neural progenitors exit the cell cycle and differentiate, distinct neuronal subtypes emerge from progenitor cells in a highly controlled spatial order, partitioning the dorsoventral axis of the neural tube into discrete regions. The correct coordination of these events requires a very tight control. We have determined that Sox5 is expressed in restricted domains of neural progenitors in the chicken neural tube. Using gain- and loss-of function approaches, we have established that Sox5 controls cell fate specification of dorsal neural progenitors and, as a result, controls the correct number of specific dorsal interneurons. Furthermore, Sox5 exerts its function restricting dorsally Wnt signaling activity by the induction of the negative Wnt pathway regulator *Axin2*. We have established that Sox5 cooperates with β -catenin in the transcriptional activation of *Axin2*, through direct binding to conserved regulatory elements. By that way, Sox5 could limit the extent of dorsal identity imposed by Wnt signaling in the spinal cord. As we have previously determined that Sox5 controls cell cycle exit in neural progenitors, Sox5 emerges now as an essential node in the transcriptional network that coordinates proliferation and dorsal patterning in the spinal cord.

INTRODUCTION

During spinal cord development distinct neuronal subtypes emerge from neural progenitor cells in a precise spatial order, organizing the dorsoventral (D-V) axis of the neural tube into discrete regions that are occupied by different neural progenitors and neuronal subtypes (Dessaud et al., 2008; Jessell, 2000). These neural progenitors are located in the ventricular zone, exit the cell cycle, then start a differentiation program and migrate laterally to constitute the mantle zone of postmitotic neurons. The right balance between differentiation and proliferation of neural progenitors ensures neural tube growth and maintenance of the progenitor niche, allowing successive rounds of differentiation of neurons and glial cells.

The dorsal and ventral neural tube midlines have been defined as signalling centres that control not only the number but the type of cells that will arise along the D-V axis. Thus, the dorsal organizing region of the roof plate generates a D-V gradient of BMPs, TGFs and Wnts factors, while the floor plate and the adjacent notochord establish an opposite V-D gradient of the morphogen Sonic hedgehog (Shh).

Dorsally, members of the BMP and Wnt families control the identity of the dorsal interneuron precursors that are involved in processing sensory information (Helms and Johnson, 2003; Liu and Niswander, 2005). Each precursor subtype occupies a precise position in the ventricular zone and is defined by the expression of a specific combinatorial code of transcription factors of the homeodomain containing (HD) group (Pax7, Dbx1 and Dbx2 among others) and proneural bHLH proteins (Math1, Ngn1 and Ngn2) (Helms and Johnson, 2003; Zhuang and Sockanathan, 2006). The Wnt canonical pathway, acting through the TCF/ β -catenin transcription complex, controls directly the expression of dorsal interneuron precursor markers such as Ngn1 (Hirabayashi et al., 2004; Muroyama et al., 2002). Moreover, Wnt1 and Wnt3a are required for the specification of dorsal dl1 and dl3 interneurons (Muroyama et al., 2002).

However, the mechanisms that the progenitors use to interpret correctly the dorsal and ventral gradients of diffusible factors are poorly understood. Recently, few cases have been described of a possible interaction between Wnt and Shh signalling pathways in the control of D-V patterning (Alvarez-Medina et al., 2008). Little is known about the integration between the control of proliferation/survival and the control of the neurogenesis pattern.

The HMG-box transcription factors of the Sox gene family could be at the core of some of those processes, as they have essential regulatory functions during neurogenesis in the vertebrate central nervous system (CNS) (Wegner and Stolt, 2005). Sox proteins participate in different processes of the CNS and PNS development. Thus, SoxB1 proteins (Sox1, Sox2, and Sox3) are involved in establishing the neuroectodermal competence and in the maintenance of the CNS stem cells (Bylund et al., 2003) while the transcriptional repressor Sox21, of the SoxB2 group, has an opposite function (Sandberg et al., 2005). Another important group of Sox genes involved in CNS development is the SoxE group (Sox8, Sox9 and Sox10), as its members modulate processes such as the specification and differentiation of CNS macroglial cells (Wegner and Stolt, 2005) and the specification, delamination and survival of neural crest cells (Cheung et al., 2005).

Very few evidences are available of the possible implications of Sox genes in the patterning of the CNS. We have recently described that Sox5 (a SoxD family member) is expressed dynamically in neural precursors in the spinal cord. Through loss- and gain-of-function analyses, we have found that Sox5 controls the timing of cell cycle exit of neural precursors at the G1-S transition, by counteracting the mitotic effect of the Wnt/ β -catenin pathway (Martinez-Morales et al., 2010). Although we have proposed that Sox5 could be acting through the transcriptional activation of the negative Wnt pathway regulator *Axin2* (Martinez-Morales et al., 2010), we are still far from knowing the precise mechanism of Sox5 action. Given the fact that the Wnt pathway

controls dorsal identity in the spinal cord, Sox5 could also affect Wnt signaling function through the control of the dorsally expressed *Axin2*.

Now, using gain- and loss-of function approaches in chicken embryos, we have determined that Sox5 controls cell fate specification of dorsal neural progenitors and interneurons in the spinal cord, inducing the transcription of the negative Wnt pathway regulator *Axin2*. Using a combination of EMSA, luciferase reporter transcriptional analysis and ChIP assays we have established that Sox5 cooperates with β -catenin in the transcriptional activation of *Axin2*, through direct binding to *Axin2* enhancer regions. Thus, Sox5 restricts proliferation and prevents the extent of dorsal identity, both imposed by Wnt signaling in the CNS.

MATERIAL AND METHODS

Constructs

Chicken Sox5 coding sequence and a mutant β -catenin where serine 33 is replaced by tyrosine (β -catenin^{CA}, (Tetsu and McCormick, 1999)), inserted into pCIG have already been described (pCIG-Sox5 and pCIG- β -catenin^{CA} ;(Martinez-Morales et al., 2010)). Two different 22 nt target sequences for cSox5 (mi1, nucleotides 1668-1689; mi2, nucleotides 2049-2070) were chosen to generate short hairpin RNAs and inserted into the pRFPRNAi vector (pRFPRNAi-Sox5;(Das et al., 2006)). Both shRNAs consistently blocked Sox5 expression (Martinez-Morales et al., 2010). As a control, a 22nt target sequence based on the luciferase coding sequence was used (pRFPRNAi-Control; (Martinez-Morales et al., 2010)). A mutated version of Sox5 (Sox5^{M569I}) was prepared by introducing a single point mutation (G for C) using the primers M569I-Fw and M569I-Rev (Table S1). The mutation changes the methionine in position 569 for an isoleucine. TOP-RFP construct contains 6 synthetic TCF-binding sites (gift from S. Pons; (Korinek et al., 1998)) and red fluorescence protein as reporter.

Chick *in ovo* electroporation

Eggs from White-Leghorn chickens were incubated at 38.5°C in an atmosphere of 70% humidity and staged according to Hamburger and Hamilton (HH) (Hamburger and Hamilton, 1951). Chick embryos were electroporated with Quiagen purified plasmid DNA at 1-2 ug/ul in PBS as previously described (Martinez-Morales et al., 2010). Eggs were further incubated for 24 to 48 hours and they were assayed for EGFP or DsRed expression in the neural tube. Subsequently, the embryos were fixed and processed for immunohistochemistry or *in situ* hybridization or were frozen for luciferase assays.

Immunohistochemistry

Embryos were fixed for 2-4 hours at 4°C with 4% paraformaldehyde in PBS, and they were immersed in 30% sucrose solution, embedded in gelatine/sacarose (7,5%/15%) or in agarose/sacarose (5%/10%) and sectioned on a Leica cryostat or a Leica vibratome (VT1000S), respectively. Immunostaining was performed as previously described (Martinez-Morales et al., 2010). Primary antibodies generated in rabbit against the following proteins were used: Sox5 (Martinez-Morales et al., 2010); Pax2 (Zymed); RFP (Molecular Probes); Lhx2/9 (gift from J. Dodd lab). Monoclonal antibodies against Brn3a (Chemicon) and Lhx1/5 (4F2), Isl1/2, Evx1, En1, Msx1/2, Lmx1, Pax7, were all obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank (developed under the auspices of NICHD and maintained by the University of Iowa). Alexa 488-, Pacific blue, Alexa 647-and Cy3-conjugated anti-mouse or anti-rabbit secondary antibodies (Molecular Probes) were used for detection and after staining, the sections were mounted in Citifluor plus Bisbenzimidazole and photographed using a Leica confocal microscope. Cell counting was carried out in 4-8 sections of at least three different embryos from each experimental condition.

***In situ* hybridization**

Embryos were fixed overnight at 4°C with 4% paraformaldehyde in PBS, rinsed and processed for whole-mount *in situ* hybridization as previously described (Martinez-Morales et al., 2010). The chick *Cath1*, *Cash1*, *Ngn1*, *Axin2*, *Msx1*, *Msx2*, *Pax3* riboprobes have been described in the literature. Three to seven embryos were analysed for each experimental condition. Hybridized embryos were postfixed in 4% paraformaldehyde, vibratome sectioned and immunostaining was performed as described above to visualize GFP+ electroporated cells.

EMSA

Extracts from transfected HEK293 cells ectopically expressing full-length Sox5, and the mutated Sox5M^{569I}, were prepared as described (Stolt et al., 2006). With these extracts, EMSA were performed in the presence of poly(dGdC), as unspecific competitor, with 32P-labeled fragments from the 5,6kb of *Axin2* promoter (described in supplementary material Table S1) and oligonucleotides containing the prototypic dimeric binding site C/C' from the MPZ promoter (Stolt et al., 2006).

Chromatin Immunoprecipitation

Chromatin immunoprecipitation assays were performed as described (Stolt et al., 2008). Briefly, cellular protein and genomic DNA from melanoma B16 cells transfected with mouse Sox5-T7-pCMV (Stolt et al., 2008) were cross-linked in 0.75% formaldehyde before chromatin extraction and sonication to an average fragment length of 300 to 600 bp. Immunoprecipitations were performed overnight at 4°C with polyclonal IgG against T7. DNA was purified from precipitates after crosslink reversal and subjected to PCR. For detection of the *Axin2* promoter, specific primers around the T6/T13 sites (Table S1) were used in 32 cycles of standard PCR with an annealing temperature of 56°C. As a positive control, primers for the Sox binding site S1 in Dct promoter were used (Stolt et al., 2008). Primers Axin2N1-Rev and Axin2N1-Forw were employed

to detect a distal fragment, 10 kb upstream from the *Axin2* ATG, used as a negative control (Table S1).

Luciferase reporter assay

Transcriptional activity assays were performed in embryos electroporated with the indicated DNAs, together with a 1 kb of *Axin2* promoter in a luciferase reporter construct (Leung et al., 2002) and two *Renilla* luciferase reporter constructs carrying the CMV and the SV40 promoter each (Promega) for normalization. Mutated versions of the *Axin2L* have been described (Martinez-Morales et al., 2010) and T6/T7 mutation was generated using specific primers (Table 1S). Luciferase activities were measured by the Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega).

Statistical analysis

Quantitative data were expressed as mean \pm SD; $n \geq 4$ embryos per experimental point, at least 4 sections per embryo were counted. Statistical analysis was performed using the IBM SPSS Statistics 20 software. Significance was assessed using Student's t-test for interneuron analysis or performing ANOVA for luciferase assays.

RESULTS

Sox5 is dynamically expressed in restricted domains of progenitors in the spinal cord

We had previously determined that Sox5 is expressed in neural progenitors in the spinal cord and that its expression decreases as progenitors exit the cell cycle and differentiate (Martinez-Morales et al., 2010). In order to determine if Sox5 expression was patterned along the D-V axis, we compared in detail the pattern of Sox5 expression with that of known D-V progenitor domain markers in chicken embryos at stages 14-24 of Hamburger and Hamilton (HH14-24). At HH14,

Sox5 was detected at low levels in proliferating progenitors whereas higher levels were observed in the dorsal premigratory and migratory neural crest cells expressing *Snail2* (Fig. 1A-C). By HH18, the expression of Sox5 in dorsal neural progenitors expressing both *Msx1/2* (Fig. 1D-F) and *Pax7* (Fig. 1D, G, H), had substantially increased relative to the expression in ventrally located progenitors (asterisk in Fig. 1D). At stage HH20, a downregulation of Sox5 expression was observed in a narrow dorsal domain, close to the roof plate where Sox5 and *Lmx1a* are coexpressed, (Fig. 1I-L). This domain of reduced Sox5 expression was more clearly defined by stage HH24 when it was possible to determine that dorsal *Cash1*⁺ and *Msx1/2*⁺ neural progenitors express Sox5 (Fig. 1M-O and Fig. 1M-P, respectively), while *Ngn1*⁺ dorsal progenitors subtype 2 (dp2) and adjacent dp1 do not express Sox5 (Fig. 1Q). This regionalized pattern of expression (summarized in Fig. 1R) suggests a possible role for Sox5 in the control of dorsal identity of neural progenitor domains.

Sox5 is required for the specification of dorsal progenitor identity

To explore the function of Sox5 in dorsal patterning, we electroporated a pCAGGS-Sox5-IRES-GFP vector (pCIG-Sox5) throughout the dorsal neural tube at stage HH11-13, before the establishment of patterned Sox5 expression in neural progenitors. Misexpression of Sox5 caused a ventral expansion of the dorsal marker *Pax7* (Fig. 2D) and conversely a restriction in the domains of *Msx1/2* (more likely due to a reduction in *Msx1* mRNA; Fig. 2E and supplementary material Fig. S1A-C) and *Pax3* expression (supplementary material Fig. S1D) after 24 hours post electroporation (PE) when compared to the left control side or with an electroporated control neural tube (pCIG; Fig. 2A, B). *Pax7* and *Msx1/2* are expressed in a broad domain of neural progenitors with poorly defined borders at early stages. However, the analysis of more restricted markers showed that progenitors misexpressing Sox5 have reduced levels of proneural gene *Cath1* (a dp1 marker; asterisk in Fig. 2K) and failed to express *Ngn1* (a dp2 marker; asterisk in

Fig. 2L). However, *Lmx1* (a roof plate marker) was ectopically expressed by dorsal progenitors misexpressing *Sox5* (Fig. 2F) in comparison with control embryos (Fig. 2C).

bHLH factors like *Cath1*, *Ngn1* and *Cash1*, on one side, and homeodomain transcription factors such as *Msx1* and *Dbx2*, on the other side, are expressed in adjacent domains and, through cross-inhibitory relations, establish and maintain the borders between the domains (Fig. 2O) (Gowan et al., 2001; Timmer et al., 2002). Thus, progenitors misexpressing *Sox5* ectopically expressed *Cash1* (normally expressed only by dp3 to dp5 progenitors; arrow in Fig. 2M) and *Dbx2* (expressed by dp5 to ventral p1; arrow in Fig. 2N) in comparison with control side and control embryos (Fig. 2I, J). In conclusion, disruption of the dorsal patterned expression of *Sox5* causes a change in the identity of dorsal progenitor dp1 and dp2 that adopt the identity of progenitors in adjacent domains, naming roof plate and dp3 domains (Fig. 2O).

We next addressed whether *Sox5* was necessary to control the identity of dorsal neural progenitors. Knocking down *Sox5* expression by specific interfering short hairpin RNAs (RNAi-*Sox5*) caused a dramatic $66\pm4\%$ reduction in *Sox5* protein levels 48 hours PE at HH19-22 (supplementary material Fig. S2) (Martinez-Morales et al., 2010). Opposite to the changes observed by ectopic overexpression of *Sox5*, dorsal domains of neural progenitors with reduced *Sox5* levels 30 hours PE, presented a retraction in the border of *Pax7* expression (Fig. 3D) and ectopic, more ventrally expanded, expression of *Msx1/2* (Fig. 3E) with respect to control electroporated embryos (RNAi-control; Fig. 3A, B). Moreover, *Lmx1* expression was reduced at the level of the roof plate upon *Sox5* shRNA electroporation (Fig. 3C, F). The pattern of dorsally expressed proneural genes was also affected upon reduction of *Sox5* levels. Thus, *Cath1* expression was slightly expanded in RNAi-*Sox5* embryos (arrow, Fig. 3J), while *Cash1* expression was severely downregulated (asterisk in Fig. 3L), and dorsal progenitors ectopically expressed *Ngn1* (arrow, Fig. 3K), in comparison to the left control side or with electroporated control neural tube (Fig. 3G-I). In summary, *Sox5* is required for the maintenance of roof plate

identity and for the specification of dorsal progenitors from the dp3-dp5 domains (summary in Fig. 3M), while ectopically expressed Sox5 interferes with dp1 and dp2 progenitor identity.

Sox5 expression is required for correct dorsal interneuron differentiation

Next, we asked if the changes in dorsal progenitor identity caused by the reduced levels of Sox5 in neural progenitors could have any consequence on the cell fate adopted by the dorsal interneurons derived from them. For that purpose, chicken embryos were electroporated at HH14 and analysed 48 hrs later (stage HH24-25), at a time when interneuron subtypes have initiated their differentiation. Dorsal interneurons were recognised by the combinatorial expression of Lhx2/9 (dl1; Fig. 4A, F), Lhx1/5+/Pax2⁻ (dl2; Fig. 4B,G), Isl1/2⁺ (dl3; Fig. 4C,H) and Pax2⁺/Brna3⁻ (dl4; Fig. 4D,I), respectively (Gross et al., 2002; Muller et al., 2002). Reducing Sox5 levels in neural progenitors (pRFPRNAi-Sox5 construct) caused a 36±13% and a 25±19% reduction in the population of dl2 and dl3 interneurons, respectively, and a lower reduction of 17±13% and 19±12% in the dl1 and dl4 populations, respectively, with respect to the embryos electroporated with the pRFPRNAi-Control construct (Fig. 4K). By contrast, no statistically significant differences were observed for more ventral populations such as dl5 (Pax2⁻/Brna3⁺; Fig. 4D,I,K), dl6 (Pax2⁺/Brna3⁻; Fig. 4E, J,K) and V0 (Evx1⁺; Fig. 4E,J,K) interneurons.

Similar analysis was done using a mutated version of the Sox5 protein (Sox5^{M569I}). A similar mutation in SRY affects DNA bending, and is described in a human with sex reversal (Murphy et al., 2001), acting as a loss of function mutation. The ectopic expression of Sox5^{M569I} caused a reduction in the dl2-dl4 interneurons (supplementary material Fig. S3) similar to that observed in embryos with reduced levels of Sox5, suggesting that, at least in chicken neural tube, Sox5^{M569I} could act as a dominant negative form. In summary, the analyses described above indicate that Sox5 controls dorsal progenitor specification and is required for the generation of the correct number of dorsal interneurons dl1-dl4 (Fig. 4L) derived from those progenitors.

Sox5 controls dorsal specification modulating Wnt canonical signalling

BMP signalling and Wnt canonical signalling are responsible for control of the identity of Class A dorsal interneurons identity (dl1-dl3) in the spinal cord. Thus, BMP is required for dp1 and dp2 domains identity (Chesnutt et al., 2004; Wine-Lee et al., 2004), while in the absence of Wnt1/Wnt3a dorsal progenitors fail to adopt dp2 and dp3 identity (Muroyama et al., 2002). Changes in dorsal progenitor identity provoked by Sox5 misexpression are reminiscent of those resulting from Wnt canonical pathways alterations. Moreover, in previous work we have shown in neural progenitors overexpressing Sox5 that the levels of the dephosphorylated and active form of β -catenin are severely decreased (Martinez-Morales et al., 2010). To determine if Sox5 could be modulating the activity of the Wnt pathway along the D-V axis, we electroporated a red fluorescent protein reporter construct to monitor the activity of the pathway (TOP-RFP; Fig. 5A) in combination with a control (PCIG) or a Sox5 expression construct. In a control situation, TCF dependent transcriptional activity was limited to dorsal neural tube (Fig. 5B) (DasGupta and Fuchs, 1999; Lee and Deneen, 2012). Ectopic expression of Sox5 did not change the dorsal restriction of the TCF reporter expression, although the level of expression was increased, maybe due to aberrant binding to TCF sites (Fig. 5C). By contrast, using the mutated form of Sox5 that could act as a dominant negative (Sox5^{M569I}; supplementary material Fig. S3A,B), TCF reporter activity was extended to the ventral neural tube (Fig. 5D). These results suggest that a reduction in Sox5 activity extends TCF- mediated Wnt activity to the ventral part of the neural tube.

Sox5 interferes with Wnt signalling in the control of cell cycle progression in the dorsal neural tube by promoting transcription of *Axin2*, a negative regulator of the Wnt canonical pathway (Martinez-Morales et al., 2010). As *Axin2* is expressed in dorsal neural tube progenitors (approximately up to dp3-dp4) (Yu et al., 2007), we asked if Sox5 is required for normal *Axin2* expression. Using the specific RNAi-Sox5 to reduce Sox5 levels we observed a drastic reduction

of *Axin2* expression in the neural tube in comparison with control embryos (Fig. 5E,F). In fact, the relevance of Axin in neural development has already been shown, as high levels of transgenic *Axin1* (functionally equivalent to *Axin2*) induces proliferation and patterning defects in the neural tube (Yu et al., 2007). In summary, these data demonstrate that *Sox5* is required for *Axin2* transcription in dorsal progenitors and for restricting the dorsal activity of Wnt canonical signalling.

Sox5 directly binds to and activates transcription of *Axin2*

Axin2 transcription is directly controlled by TCF/ β -catenin through binding to TCF/LEF conserved sites present in the 5' region and first intron (Jho et al., 2002). This genomic region of 5.6-kb contains eight conserved TCF/LEF consensus binding sites (T1-T8 in italics in Fig. 6A) that have been previously characterized by luciferase assays (Jho et al., 2002; Leung et al., 2002).

In order to determine if *Sox5* directly controls *Axin2* transcription we searched for the presence of conserved Sox binding sites in the 5.6-kb *Axin2* DNA fragment, using the heptameric consensus for Sox binding sites (A/T)(A/T)CAA(A/T)G. The same eight TCF/LEF sites could be potential binding sites for *Sox5* and we found five more putative sites (T9-T13 in red; Fig. 6A). By electrophoretic mobility shift assays the 13 putative sites were tested for *Sox5* binding using extracts of transfected HEK293 cells as protein source. The various sites showed widely varying binding affinities for *Sox5* (Fig. 6B and supplementary material Table S1). Interestingly, three of these sites with high/medium affinity (T6, T7 and T8) are localized within the 1 kb region previously identified for mediating *Sox5*-dependent stimulation (Martinez-Morales et al., 2010).

T7 has been described as essential for TCF-mediated transcription of *Axin2* (Leung et al, 2002; Martinez-Morales et al, 2010). To determine the relevance of the T6 and T8 sites, deletions and single point mutations were performed. The deletion of 856bp of the *Axin2*L region, that includes the T6 and T13 sites (*Axin2*S in Fig. 6D, E), or the single point mutation of site T6 (*Axin2*LT6/T13* in Fig. 6D, E) were sufficient to abolish the synergistic activity of *Sox5* and β -

catenin^{CA} on *Axin2* reporter constructs in electroporated neural progenitors in HH12 chicken embryos (Fig. 6D, E). In fact, in the context of *Axin2S* construct, that lack sites T6/T13, Sox5 decreased β -catenin activity probably through competition for the T7 binding site. As previously described, the T7 site was essential to drive *Axin2* reporter expression by TCF/ β -catenin (*Axin2L* T7* and *Axin2S* T7*; Fig. 6D, E) (Jho et al., 2002; Leung et al., 2002) and shows medium binding affinity for Sox5, as determined by the EMSA assays (Fig. 6B).

To proof the relevance of Sox5 binding to the *Axin2* regulatory regions, we performed chromatin immunoprecipitation (ChIP)-PCR assays in B16 melanoma cells transiently expressing T7-tagged Sox5. Anti-T7 antibodies precipitated a region of the *Axin2* intron that comprises T6 and T13 sites (Fig. 6C) but not a distal fragment from the *Axin2* upstream region.

To further confirm the requirement for Sox5 binding to the *Axin2* enhancer region, we used the mutated version of Sox5 that contains a single point mutation in the HMG domain (Sox5^{M569I}; Fig. 7A), which behaves as a dominant negative form (Fig. S3). Sox5^{M569I} showed a reduced binding affinity for T6, T7, T8 and T13 sites (Fig. 7B). Furthermore, Sox5^{M569I} cannot activate *Axin2* reporters when coelectroporated with β -catenin^{CA} (Fig. 7C). Although, it would require further analysis, the possibility of direct interaction between Sox5 and β -catenin cannot be excluded and could explain why the Sox5^{M569I} DNA-binding defective form blocks β -catenin transcriptional activity on *Axin2* enhancer (Fig. 7C).

All these results proof that Sox5 binding to, at least, the T6 site in the *Axin2* locus is required to enhance *Axin2* transcription. This mechanism could explain how Sox5 counteracts dorsal Wnt activity promoting the dorsal transcription of *Axin2* and preventing the extension of Wnt-imposed dorsal identity in the spinal cord (Fig. 8).

DISCUSSION

In this study we have demonstrated how Sox5 transcription factor is involved in controlling the dorsal patterning of the spinal cord to establish the correct numbers of dorsal interneurons. Moreover, our results unveil that Sox5 directly controls the transcriptional activation of the Wnt pathway inhibitor Axin2 through conserved binding sites present in the first intron. By increasing Axin2 levels in the dorsal neural tube, Sox5 would restrict the extension of dorsal identity imposed by the Wnt pathway in the spinal cord.

The mechanisms controlling cell fate specification of neural precursors in the spinal cord have been extensively studied. Dorsally, members of the BMP and Wnt families control the identity of the Class A dorsal interneurons (dl1-dl3 subtypes) (Helms and Johnson, 2003; Zhuang and Sockanathan, 2006). The Class B dorsal interneurons, that comprise dl4-dl6, depend on other signals for their generation that could include retinoic acid (Zhuang and Sockanathan, 2006). BMP signalling is required for roof plate identity or maintenance (Millen et al., 2004), for the specification of dl1 and, to a lesser extent, dl2 interneurons (Chesnutt et al., 2004; Wine-Lee et al., 2004). On the other hand, the canonical Wnt pathway controls the expression of dorsal interneuron precursor markers such as *Ngn1* and *Math1* and is required for the specification of interneurons dl1-dl3 (Hirabayashi et al., 2004; Muroyama et al., 2002). In complementary assays, the dorsal expansion of β -catenin activity caused an increase in either dl1 (Ille et al., 2007) or in dl2 and dl3 (Zechner et al., 2007), depending on the local extent of the ectopical β -catenin activation. The increase in dorsal interneurons is concomitant with the reduction in adjacent interneuron populations (dl2-dl3 or dl4-dl5, respectively).

In Sox5 loss-of-function experiments, the changes in the identity of dp3-dp5 neural progenitors and the reduction of the dl2-dl3 interneurons (those more strongly affected) are similar to the effects of excessive canonical Wnt signaling. Moreover, the Wnt/ β -catenin transcriptional activity, detected through a TCF-reporter construct, is ventrally expanded when

Sox5 activity is reduced. Clearly, part of the Sox5 function is exerted through the control of the canonical Wnt pathway. However, at this point we cannot exclude that Sox5 could interfere with BMP signaling in the control of roof plate identity and dl1 final number. Additionally, Sox5 could modulate the activity of signals involved in Class B subtype specification, as Sox5 is also required for the correct number of dl4 interneurons.

In comparison with alterations in Wnt signalling, interference with Sox5 leads to a reduction of dl1-dl4 interneurons, without a simultaneous increase in more ventral interneuron populations. This is probably due to the fact that Sox5 is also required for survival of neural progenitors, (Martinez-Morales et al., 2010) and thus, the miss-specified progenitors would die by apoptosis instead of giving rise to more ventral interneurons.

In embryos with reduced Sox5 levels, we have observed that the dp2 domain is enlarged while the number of dl2 interneurons is clearly reduced. How could this be explained?. As Sox5 is also required for cell cycle exit in neural progenitors (Martínez-Morales et al., 2010), the reduction in dl2 interneurons could be due to a more severe delay in the differentiation of dp2 progenitors in relation to other dorsal and ventral progenitors. Although not thoroughly studied in the spinal cord, neuronal differentiation follows some order, with dl2 interneurons and motoneurons differentiating earlier than other interneurons (our observations and (Hartenstein, 1993)). However, it is not clear if the time of cell cycle exit could play a role in cell fate acquisition in the neural tube, as it is the case in cortex development. In mouse cortex, Sox5 controls the sequential generation of distinct corticofugal neuron subtypes (Lai et al., 2008). Our results open the possibility that Sox5 in the spinal cord, apart from controlling neural progenitor specification, could also be required to control the order of neuronal differentiation.

There are very scarce examples in the literature for Sox genes having a role in patterning the CNS. In the spinal cord, patterning the neuroectoderm in different neural progenitor domains is a prerequisite for the generation of the correct neuron subtypes along the D-V axis. Recently, it

has been shown during neocortical development in mouse embryos that Sox5 and Sox6 are expressed in mutually exclusive ventral (subpallium) and dorsal (pallium) progenitors, respectively. The Sox6 mutant neocortex shows an alteration in the identity of the dorsal progenitors, with the ectopic expression of subpallium markers such as *Mash1*, *Isl1* or Sox5 (Azim et al., 2009). However, those changes in neural progenitor identity did not affect the specification of the projection neurons derived from them. In the spinal cord, we have now determined how a Sox5 decrease causes both a change in the identity of dorsal progenitors and also differentially affects the number of specific interneurons derived from those progenitors.

There are several examples of Sox genes controlling the activity of the Wnt signalling pathway acting at different molecular levels (Bernard and Harley, 2010). For instance, in the case of SoxD family genes, Sox13 binds directly to TCF1 (Melichar et al., 2007) inhibiting its transcriptional activity while Sox6 binds to β -catenin, recruiting histone deacetylase and repressing cyclin D1 expression (Iguchi et al., 2007). Here, we have demonstrated that Sox5 binds directly to a conserved site present in the first intron of *Axin2* and cooperates with TCF/ β -catenin in the transcriptional activation of *Axin2*. By increasing *Axin2* levels, Sox5 would control the feedback repressor pathway regulating Wnt signalling. A similar mechanism of induction of Wnt signalling repressors, such as Groucho/TLE factors, has been previously proposed for Sox9 in the intestinal epithelium (Bastide et al., 2007). However, until now there was no evidence of direct regulation of a Wnt repressor by a Sox factor.

We have previously demonstrated that Sox5 controls the timing of cell cycle exit of neural precursors, by counteracting the mitotic effect of the Wnt/ β -catenin pathway (Martinez-Morales et al., 2010). Now, our results proof that Sox5 is also required for the control of dorsal identity of neural progenitors and interneurons. Thus, these results highlight the importance of Sox5 as a key coordinator of proliferation and patterning during development of the dorsal spinal cord.

Acknowledgements

We thank A. Arias, V. Barbero, O. Parreño and M.C. Escudero for technical assistance. R. Diez del Corral and P. Bovolenta for their comments and support. E. Martí for β -catenin^{CA} construct, S.Pons for the TOP-RFP construct, E. Fearon for the *Axin2* promoter, R. Das and S.A. Wilson for the pRFPRNAi vector and J. Dodd for the anti-Lhx2/9 antibody. Work was funded by the Spanish MCINN grants to A.V.M. (BFU2008-02963, BFU2010-15665, BFU2011-29490). A.V.M. was supported by RyC Programme, A.C.Q. by JAE Programme.

References

- Alvarez-Medina, R., Cayuso, J., Okubo, T., Takada, S. and Marti, E.** (2008). Wnt canonical pathway restricts graded Shh/Gli patterning activity through the regulation of Gli3 expression. *Development* **135**, 237-247.
- Azim, E., Jabaudon, D., Fame, R. M. and Macklis, J. D.** (2009). SOX6 controls dorsal progenitor identity and interneuron diversity during neocortical development. *Nat Neurosci* **12**, 1238-1247.
- Bastide, P., Darido, C., Pannequin, J., Kist, R., Robine, S., Marty-Double, C., Bibeau, F., Scherer, G., Joubert, D., Hollande, F., et al.** (2007). Sox9 regulates cell proliferation and is required for Paneth cell differentiation in the intestinal epithelium. *The Journal of Cell Biology* **178**, 635-648.
- Bernard, P. and Harley, V. R.** (2010). Acquisition of SOX transcription factor specificity through protein-protein interaction, modulation of Wnt signalling and post-translational modification. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **42**, 400-410.
- Bylund, M., Andersson, E., Novitsch, B. G. and Muhr, J.** (2003). Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity. *Nat Neurosci* **6**, 1162-1168.
- Chesnutt, C., Burrus, L. W., Brown, A. M. C. and Niswander, L.** (2004). Coordinate regulation of neural tube patterning and proliferation by TGF β and WNT activity. *Developmental Biology* **274**, 334-347.
- Cheung, M., Chaboissier, M. C., Mynett, A., Hirst, E., Schedl, A. and Briscoe, J.** (2005). The transcriptional control of trunk neural crest induction, survival, and delamination. *Developmental cell* **8**, 179-192.

- Das, R. M., Van Hateren, N. J., Howell, G. R., Farrell, E. R., Bangs, F. K., Porteous, V. C., Manning, E. M., McGrew, M. J., Ohyama, K., Sacco, M. A., et al.** (2006). A robust system for RNA interference in the chicken using a modified microRNA operon. *Developmental Biology* **294**, 554-563.
- DasGupta, R. and Fuchs, E.** (1999). Multiple roles for activated LEF/TCF transcription complexes during hair follicle development and differentiation. *Development* **126**, 4557-4568.
- Dessaud, E., McMahon, A. P. and Briscoe, J.** (2008). Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network. *Development* **135**, 2489-2503.
- Gowan, K., Helms, A. W., Hunsaker, T. L., Collisson, T., Ebert, P. J., Odom, R. and Johnson, J. E.** (2001). Crossinhibitory activities of Ngn1 and Math1 allow specification of distinct dorsal interneurons. *Neuron* **31**, 219-232.
- Gross, M. K., Dottori, M. and Goulding, M.** (2002). Lbx1 specifies somatosensory association interneurons in the dorsal spinal cord. *Neuron* **34**, 535-549.
- Hamburger, V. and Hamilton, H. L.** (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology* **88**, 49-92.
- Hartenstein, V.** (1993). Early pattern of neuronal differentiation in the *Xenopus* embryonic brainstem and spinal cord. *The Journal of comparative neurology* **328**, 213-231.
- Helms, A. W. and Johnson, J. E.** (2003). Specification of dorsal spinal cord interneurons. *Current Opinion in Neurobiology* **13**, 42-49.
- Hirabayashi, Y., Itoh, Y., Tabata, H., Nakajima, K., Akiyama, T., Masuyama, N. and Gotoh, Y.** (2004). The Wnt/ β -catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells. *Development* **131**, 2791-2801.
- Iguchi, H., Urashima, Y., Inagaki, Y., Ikeda, Y., Okamura, M., Tanaka, T., Uchida, A., Yamamoto, T. T., Kodama, T. and Sakai, J.** (2007). SOX6 suppresses cyclin D1 promoter activity by interacting with β -catenin and histone deacetylase 1, and its down-regulation induces pancreatic β -cell proliferation. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 19052-19061.
- Ille, F., Atanasoski, S., Falk, S., Ittner, L. M., Märki, D., Büchmann-Møller, S., Wurdak, H., Suter, U., Taketo, M. M. and Sommer, L.** (2007). Wnt/BMP signal integration regulates the balance between proliferation and differentiation of neuroepithelial cells in the dorsal spinal cord. *Developmental Biology* **304**, 394-408.

- Jessell, T. M.** (2000). Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet* **1**, 20-29.
- Jho, E.-h., Zhang, T., Domon, C., Joo, C.-K., Freund, J.-N. and Costantini, F.** (2002). Wnt/ β -Catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Molecular and Cellular Biology* **22**, 1172-1183.
- Korinek, V., Barker, N., Willert, K., Molenaar, M., Roose, J., Wagenaar, G., Markman, M., Lamers, W., Destree, O. and Clevers, H.** (1998). Two members of the Tcf family implicated in Wnt/ β -Catenin signaling during embryogenesis in the mouse. *Molecular and Cellular Biology* **18**, 1248-1256.
- Lai, T., Jabaudon, D., Molyneaux, B. J., Azim, E., Arlotta, P., Menezes, J. R. and Macklis, J. D.** (2008). SOX5 controls the sequential generation of distinct corticofugal neuron subtypes. *Neuron* **57**, 232-247.
- Lee, H. K. and Deneen, B.** (2012). Daam2 is required for dorsal patterning via modulation of canonical Wnt signaling in the developing spinal cord. *Developmental cell* **22**, 183-196.
- Leung, J. Y., Kolligs, F. T., Wu, R., Zhai, Y., Kuick, R., Hanash, S., Cho, K. R. and Fearon, E. R.** (2002). Activation of AXIN2 expression by β -Catenin-T cell factor: a feedback repressor pathway regulating Wnt signaling. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 21657-21665.
- Liu, A. and Niswander, L. A.** (2005). Bone morphogenetic protein signalling and vertebrate nervous system development. *Nature Reviews Neuroscience* **6**, 945-954.
- Martinez-Morales, P. L., Quiroga, A. C., Barbas, J. A. and Morales, A. V.** (2010). SOX5 controls cell cycle progression in neural progenitors by interfering with the WNT-[β]-catenin pathway. *EMBO Rep* **11**, 466-472.
- Melichar, H. J., Narayan, K., Der, S. D., Hiraoka, Y., Gardiol, N., Jeannet, G., Held, W., Chambers, C. A. and Kang, J.** (2007). Regulation of $\gamma\delta$ Versus $\alpha\beta$ T Lymphocyte Differentiation by the Transcription Factor SOX13. *Science* **315**, 230-233.
- Millen, K. J., Millonig, J. H. and Hatten, M. E.** (2004). Roof plate and dorsal spinal cord dl1 interneuron development in the dreher mutant mouse. *Developmental Biology* **270**, 382-392.
- Muller, T., Brohmann, H., Pierani, A., Heppenstall, P. A., Lewin, G. R., Jessell, T. M. and Birchmeier, C.** (2002). The homeodomain factor *lhx1* distinguishes two major programs of neuronal differentiation in the dorsal spinal cord. *Neuron* **34**, 551-562.

- Muroyama, Y., Fujihara, M., Ikeya, M., Kondoh, H. and Takada, S.** (2002). Wnt signaling plays an essential role in neuronal specification of the dorsal spinal cord. *Genes & development* **16**, 548-553.
- Murphy, E. C., Zhurkin, V. B., Louis, J. M., Cornilescu, G. and Clore, G. M.** (2001). Structural basis for SRY-dependent 46-X,Y sex reversal: modulation of DNA bending by a naturally occurring point mutation. *Journal of Molecular Biology* **312**, 481-499.
- Sandberg, M., Kallstrom, M. and Muhr, J.** (2005). Sox21 promotes the progression of vertebrate neurogenesis. *Nat Neurosci* **8**, 995-1001.
- Stolt, C. C., Lommes, P., Hillgärtner, S. and Wegner, M.** (2008). The transcription factor Sox5 modulates Sox10 function during melanocyte development. *Nucleic Acids Research* **36**, 5427-5440.
- Stolt, C. C., Schlierf, A., Lommes, P., Hillgartner, S., Werner, T., Kosian, T., Sock, E., Kessaris, N., Richardson, W. D., Lefebvre, V., et al.** (2006). SoxD proteins influence multiple stages of oligodendrocyte development and modulate SoxE protein function. *Developmental Cell* **11**, 697-709.
- Tetsu, O. and McCormick, F.** (1999). [beta]-Catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* **398**, 422-426.
- Timmer, J. R., Wang, C. and Niswander, L.** (2002). BMP signaling patterns the dorsal and intermediate neural tube via regulation of homeobox and helix-loop-helix transcription factors. *Development* **129**, 2459-2472.
- Wegner, M. and Stolt, C. C.** (2005). From stem cells to neurons and glia: a Soxist's view of neural development. *Trends in Neurosciences* **28**, 583-588.
- Wine-Lee, L., Ahn, K. J., Richardson, R. D., Mishina, Y., Lyons, K. M. and Crenshaw, E. B.** (2004). Signaling through BMP type 1 receptors is required for development of interneuron cell types in the dorsal spinal cord. *Development* **131**, 5393-5403.
- Yu, H. M., Liu, B., Costantini, F. and Hsu, W.** (2007). Impaired neural development caused by inducible expression of Axin in transgenic mice. *Mechanisms of development* **124**, 146-156.
- Zechner, D., Müller, T., Wende, H., Walther, I., Taketo, M. M., Crenshaw Iii, E. B., Treier, M., Birchmeier, W. and Birchmeier, C.** (2007). Bmp and Wnt/ β -catenin signals control expression of the transcription factor Olig3 and the specification of spinal cord neurons. *Developmental Biology* **303**, 181-190.
- Zhuang, B. Q. and Sockanathan, S.** (2006). Dorsal–ventral patterning: a view from the top. *Current Opinion in Neurobiology* **16**, 20-24.

Figure legends

Fig. 1. Sox5 is expressed in specific domains of dorsal neural progenitors.

Immunohistochemistry (**A-O**) and double *in situ* hybridization (**P,Q**) of chicken embryo sections at the indicated stages. (**A**) At stage HH14, Sox5 is expressed dorsally in neural crest cells, ventrally in floor plate cells and at lower levels in the majority of the neuroepithelial cells. (**B, C**) Sox5 is co-expressed with Snail2. (**D**) At HH18 Sox5 is downregulated in the ventral tube. (**E-H**) Sox5 is co-expressed with Msx1/2 and Pax7 in dorsal progenitors. (**I-L**) Sox5 is expressed at stage HH20 in dorsal and intermediate progenitors as well as in Lmx1⁺ roof plate cells. (**M-O**) At stage HH24 Sox5 is expressed in dorsal neural progenitors expressing low levels of Msx1/2. (**P,Q**) Sox5 is co-expressed in dp3-dp5 progenitors with *Cash1* (**P**) and with *Ngn1* in dp2 progenitors (**Q**). (**R**) Scheme describing progenitor domains, and neurons (dl3 and motoneurons, MN) that express Sox5 (in green) in HH24 spinal cord.

Fig. 2. Sox5 misexpression alters dorsal progenitor identity.

pCIG (**A-C'** and **G-J**) and pCIG-Sox5 (**D-F'**, **K-N**) were electroporated at HH11 and analyzed 24 hours PE at HH17-18 by immunohistochemistry (**A-F'**) or by *in situ* hybridization (**G-N**). (**D,D'**) Pax7 expression is expanded ventrally in embryos with Sox5 elevated levels (white arrows). Sox5 ectopic over-expression decreases Msx1/2 expression (**E,E'**; white asterisk) and extends Lmx1 expression (**F,F'**; white arrow). *Cath1* expression is slightly downregulated (**K**) while *Ngn1* expression is dramatically reduced (**L**; black asterisk) in embryos over-expressing Sox5. On the other hand, *Cash1* (**M**) and *Dbx2* (**N**) expression are dorsally expanded in pCIG-Sox5 electroporated progenitors (black arrows). (**O**) Scheme of dorsal progenitor identity alterations in Sox5 electroporated embryos. See also Fig. S1.

Fig. 3. Sox5 is required for the correct specification of dorsal neural progenitors.

pRFPRNAi-C (**A-C''**, **G-I**) and pRFPRNAi-Sox5 (**D-F''**, **J-L**) were electroporated at HH11 and analyzed 24 hours PE at HH17-18 by immunohistochemistry (**A-F''**) or by *in situ* hybridization (**G-L**). Pax7 (**D,D'**; white asterisk), Lmx1 (**F-F''**) and *Cash1* (**L**, black asterisk) expression is reduced in relation to that of pRFPRNAi-control embryos (**A,A'**, **C-C''**,**I**). Knocking down Sox5 expression expands the territory of *Msx1/2* (**E,E'**; white arrow), *Cath1* (**J**, black arrow) and *Ngn1* (**K**, black arrow) expressing neural cells in relation to pRFPRNAi-control (**B,B'**,**G,H**). (**M**) Summary for dorsal identity alterations in electroporated embryos. See also Fig. S2.

Fig. 4. Sox5 is necessary for dorsal interneuron specification. pRFPRNAi-C (**A-E'**) and pRFPRNAi-Sox5 (**F-J'**) were electroporated at HH14 and analyzed 48 hours PE at HH22-24 by immunohistochemistry. Panels **A'-J'** show the right electroporated side visualized with RFP. (**A-J'**) Reducing Sox5 levels causes a decrease in dl1 (Lhx2/9⁺ cells; **F**), dl2 (Lhx1/5⁺/Pax2⁻ cells; **G**), dl3 (Islet 1/2⁺ cells; **H**), dl4 (Pax2⁺/Brn3a⁻ cells; **I**) and dl5 (Brn3a⁺/Pax2⁻ cells; **J**) dorsal interneurons in relation with pRFPRNAi embryos (**A-E'**). Not significant changes were observed for the dl6 (Pax2⁺/Evx1⁻ cells) and v0 (Evx1⁺ cells) populations (**J**) in relation with control embryos (**E**). (**I**) Quantitative analysis of interneurons subpopulations represented as mean +/- SD of the number of cells in the electroporated side that expresses a marker respect to the cells expressing the same that marker in the non electroporated side (% cells⁺ EP/cells⁺ C). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.003. (**L**) Summary of the alterations in dorsal interneuron identities in pRFPRNAi-Sox5 electroporated embryos. See also Fig. S4.

Fig. 5. Sox5 is required to restrict dorsal Wnt signaling activity and Axin2 expression.

HH11 embryos were electroporated with a Wnt signaling reporter construct (TOP-RFP) (**A**) and control PCIG (**B,B'**), PCIG-Sox5 (**C,C'**) or a mutated version of Sox5^{M569I}, pCIG- Sox5^{M569I}, (**D,D'**)

and analyzed 24 hr PE. RFP expression was ventrally expanded when the mutated Sox5^{M569I} was introduced (D). (E-F') Analysis of *Axin2* expression in HH11 embryos electroporated with pRFPRNAi-C (E,E') or pRFPRNAi-Sox5 (F,F'). See also Fig. S3 and S4.

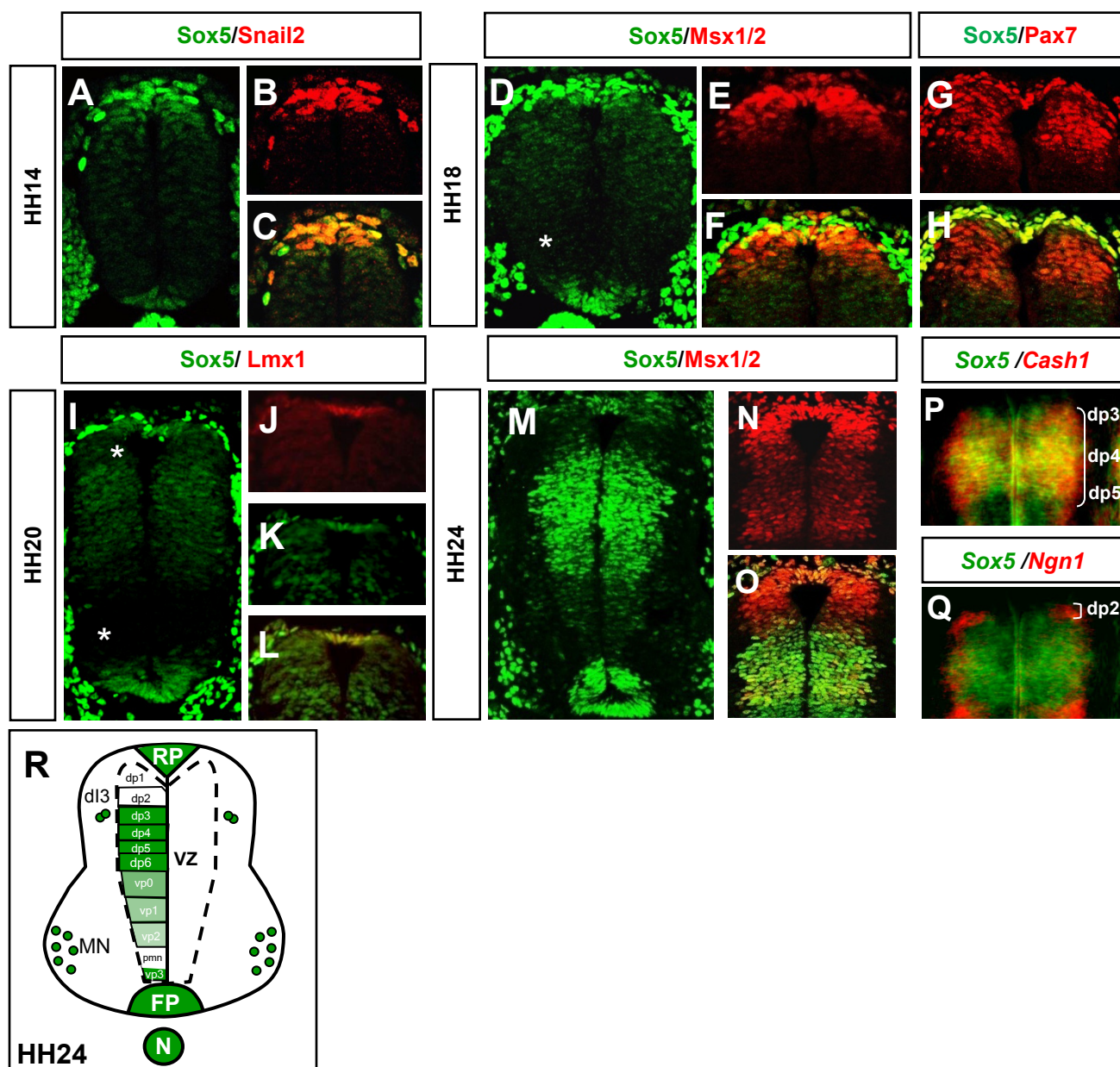
Fig. 6. Binding of Sox5 to a conserved site in the *Axin2* first intron is required for enhancing the ability of β -catenin/TCF to activate *Axin2* transcription. (A) Conserved Sox5 binding sites present in the promoter region and first intron of mouse *Axin2* (T1 to T13). Binding sites T1 to T8 have already been described as TCF binding sites (23). The binding sites T9 to T13 labelled in red are newly identified as putative Sox binding sites. (B) Sox5 ability to bind the 13 sites was tested by EMSA. C/C' is a dimeric Sox binding site for SoxD and SoxE genes described in the Myelin Protein Zero gene (Peirano et al., 2000). Extracts from Sox5 transfected HEK293 cells served as a source of full-length Sox5. E is the control with EGFP transfected cells. The specific complexes with the presence of Sox5 are the top bands. (C) Immunoprecipitation was performed on chromatin from B16 melanoma cells transfected with Sox5-T7 in the absence (H₂O) or presence of control antibodies (IgG) or anti-T7 antibodies. (D) Schematic representation of *Axin2* reporter gene constructs used. (E) Stage HH11 embryos were electroporated with the indicated *Axin2* reporter constructs and analyzed 24 hours PE. Quantitative analysis of the transcriptional activity of Sox5 alone or in combination with β -catenin^{CA} on the different *Axin2* promoter constructs. Graphs show normalized luciferase units relative to pCIg control. Each bar represents mean \pm SD of triplicate experiments. *p<0.05, **p<0.02, ***p<0.005.

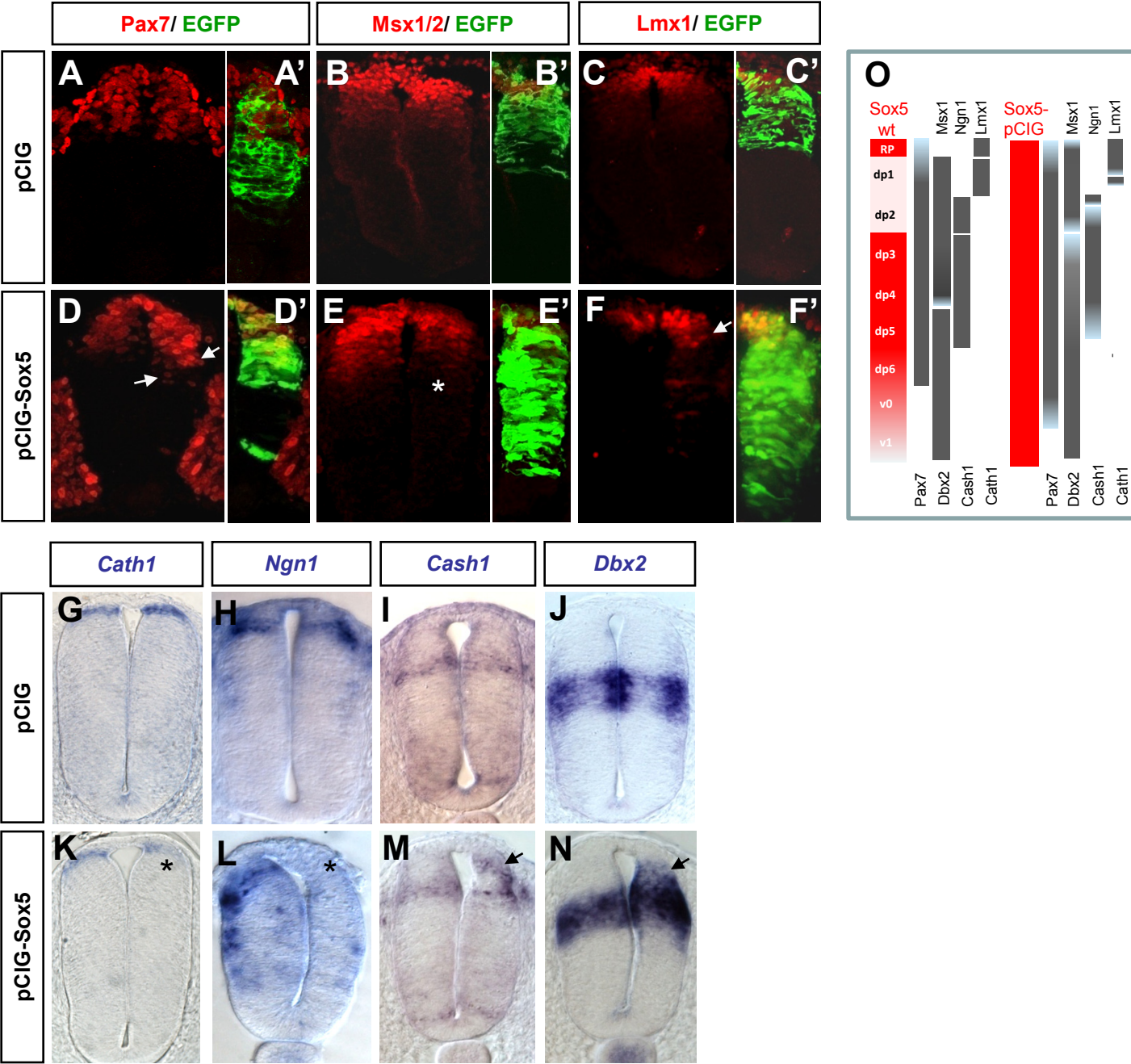
Fig. 7. Sox5^{M569I} mutated form shows reduced binding to DNA and does not enhance *Axin2* transcription. (A) Schematic representation of Sox5^{M569I} mutation based on a similar mutation in SRY that affects DNA bending, and is described in a human with sex reversal (Murphy et al.,

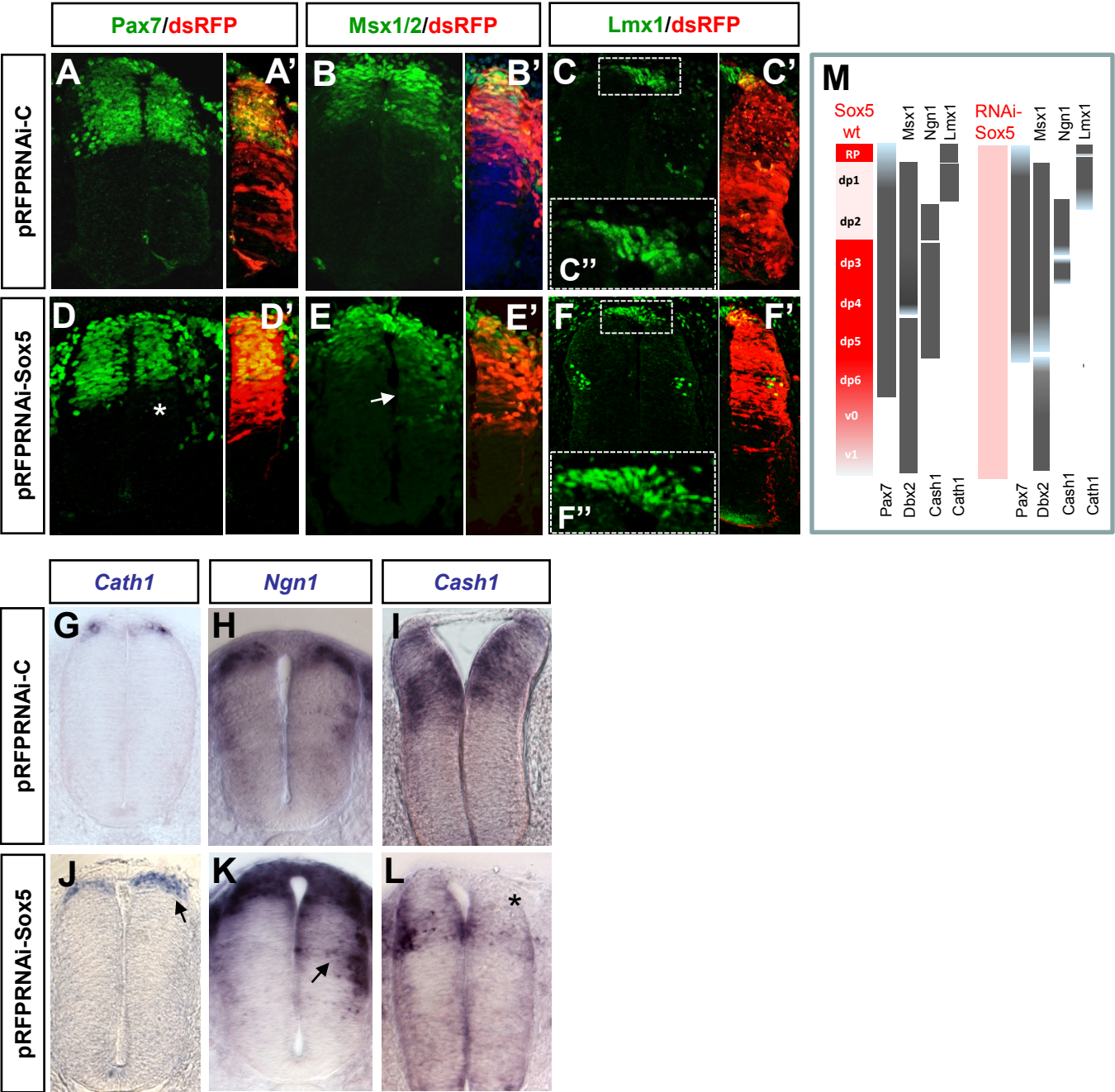
2001). (B) EMSA assays showing reduced binding ability of Sox5^{M569I} (S5*) in comparison with the long Sox5 chicken isoform (S5) to the Sox5 binding sites characterized in the *Axin2* locus.

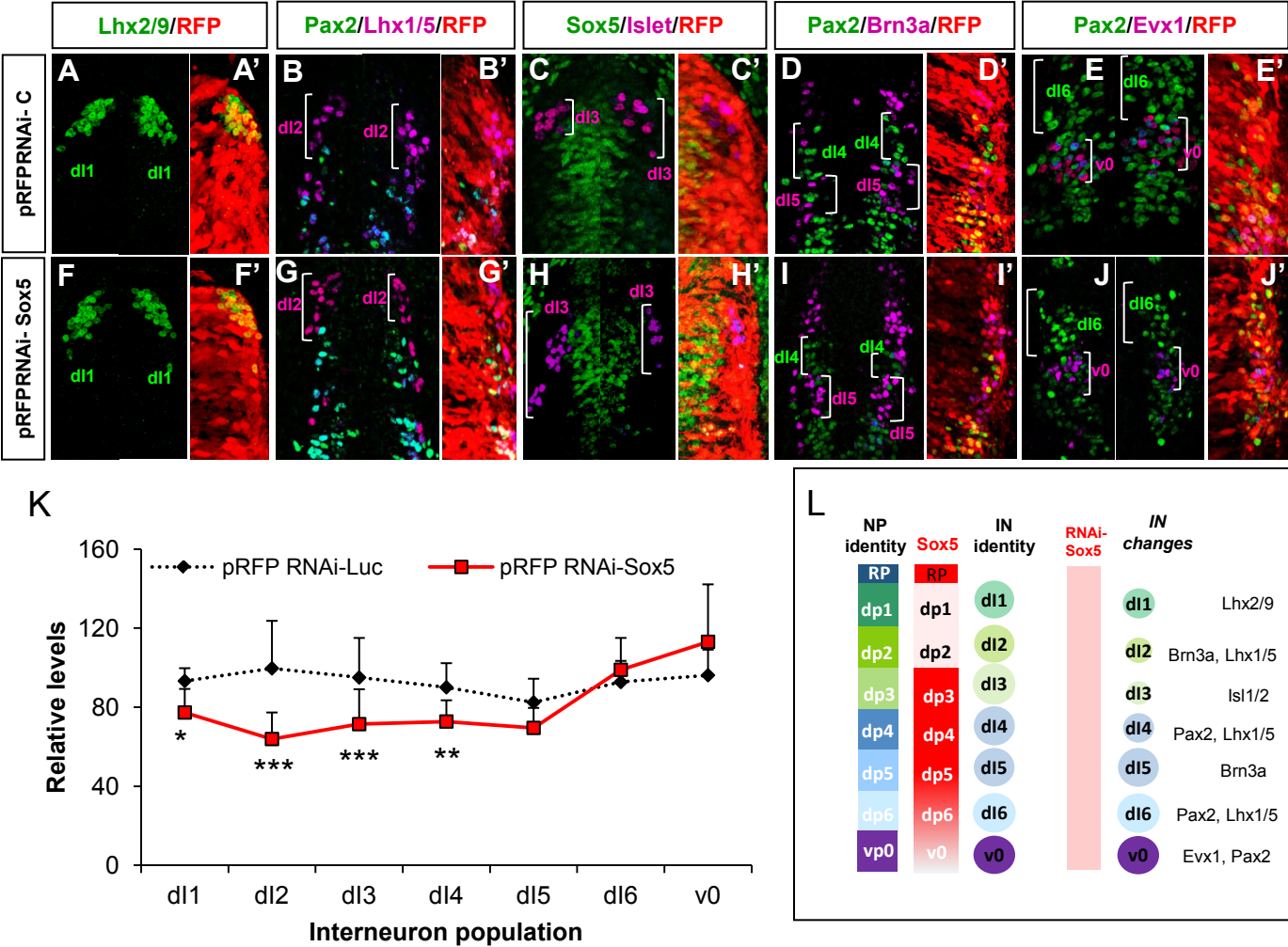
(C) Stage HH11 embryos were electroporated with Axin2L wt and analyzed 24 hours PE. Quantitative analysis of the transcriptional activity of Sox5 or Sox5^{M569I} (Sox5*) alone or in combination with β -catenin^{CA} (β -cat) on the Axin2L promoter construct. Sox5^{M569I} over-expression does not enhance *Axin2* transcription in combination with β -catenin. Graphs show normalized luciferase units relative to pCIG control. Each bar represents mean \pm SD of triplicate experiments. *p<0.05.

Fig. 8. Model for Sox5 action on Wnt signalling pathway in the control of dorsal identity in the spinal cord (see main text).

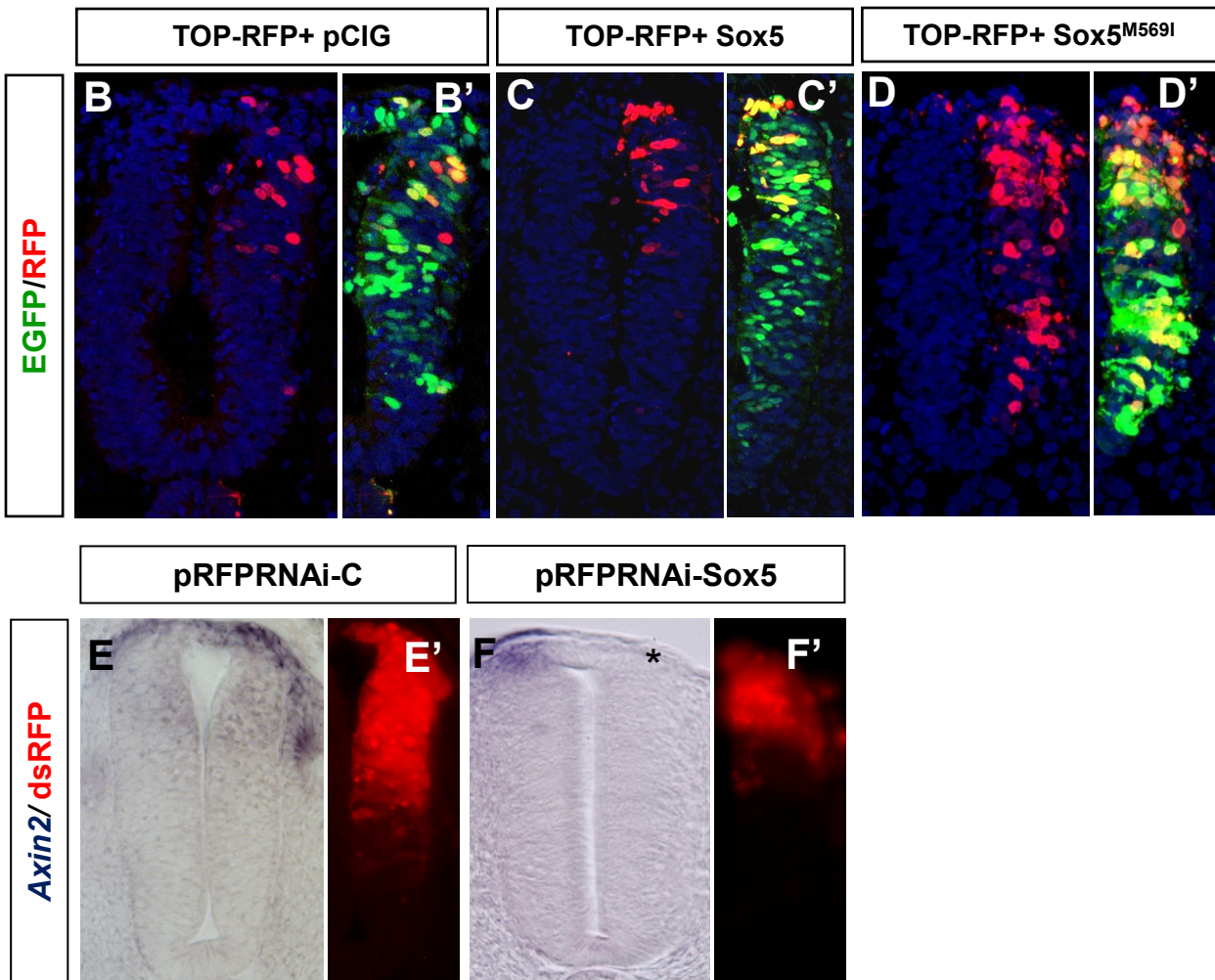
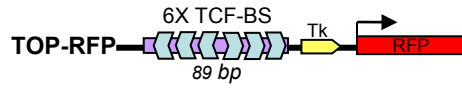


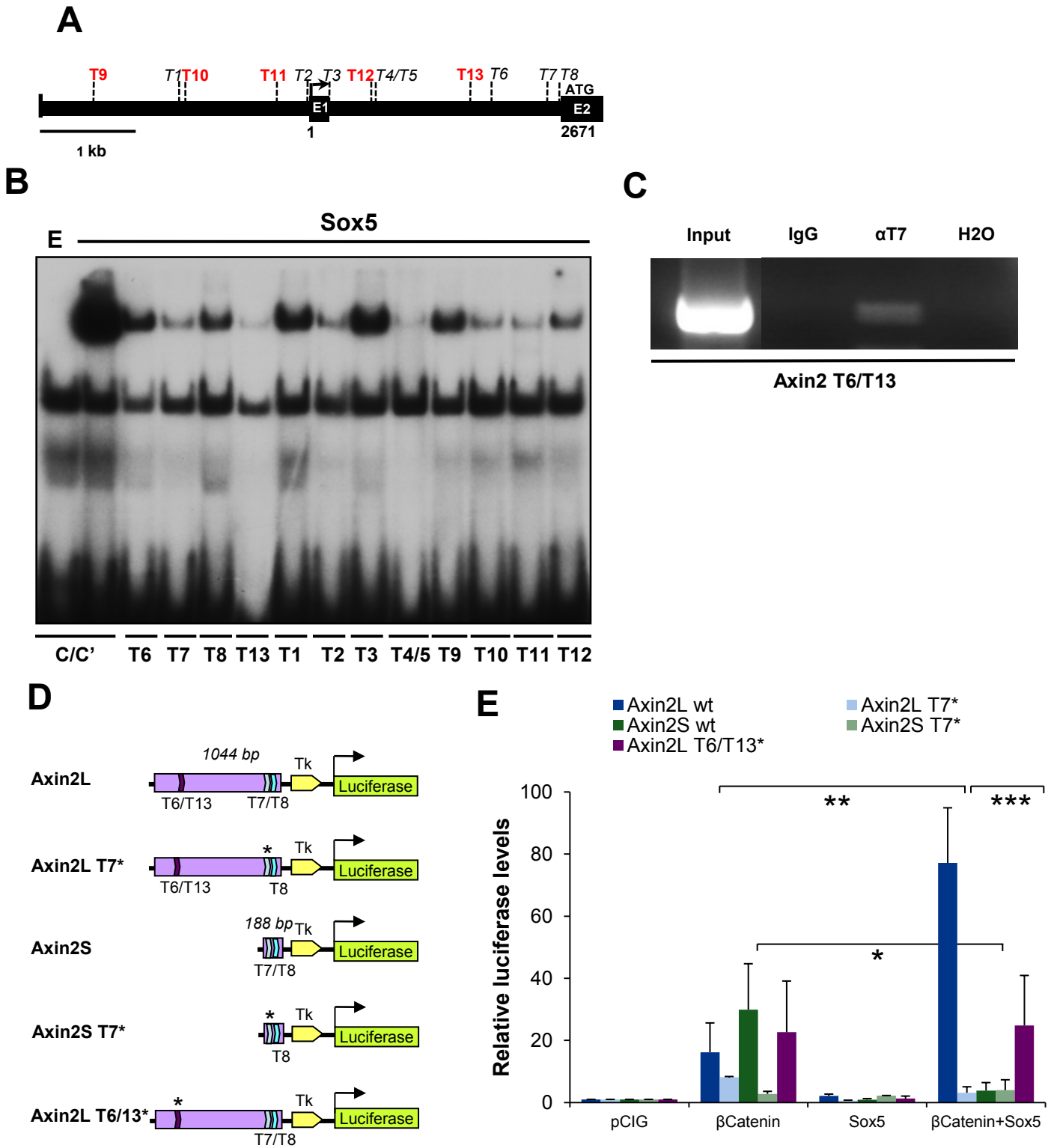




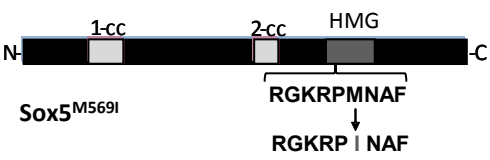


A

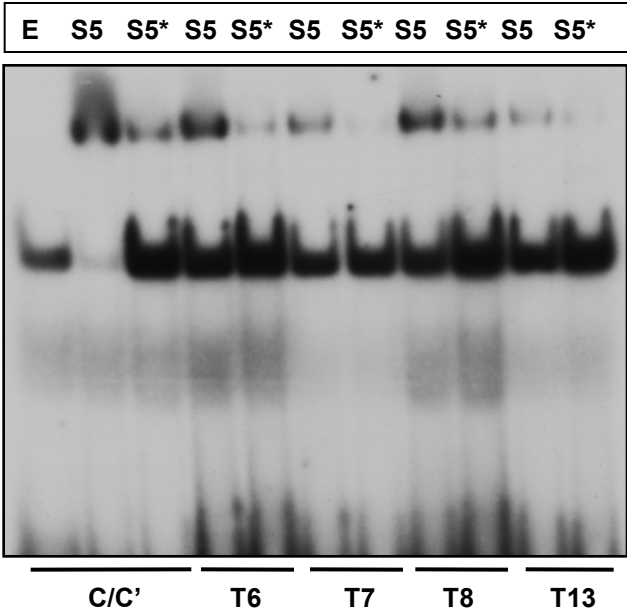




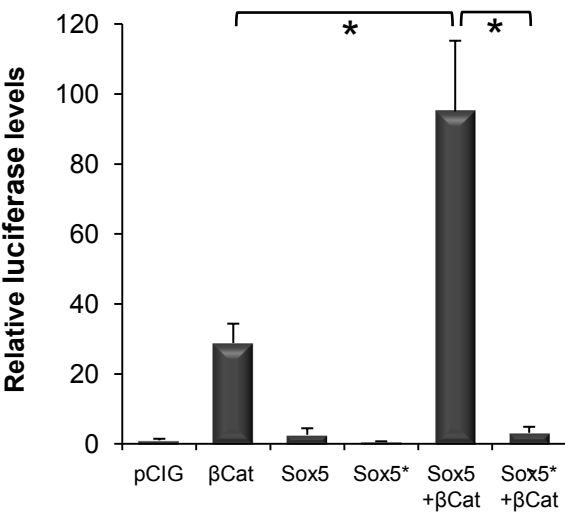
A

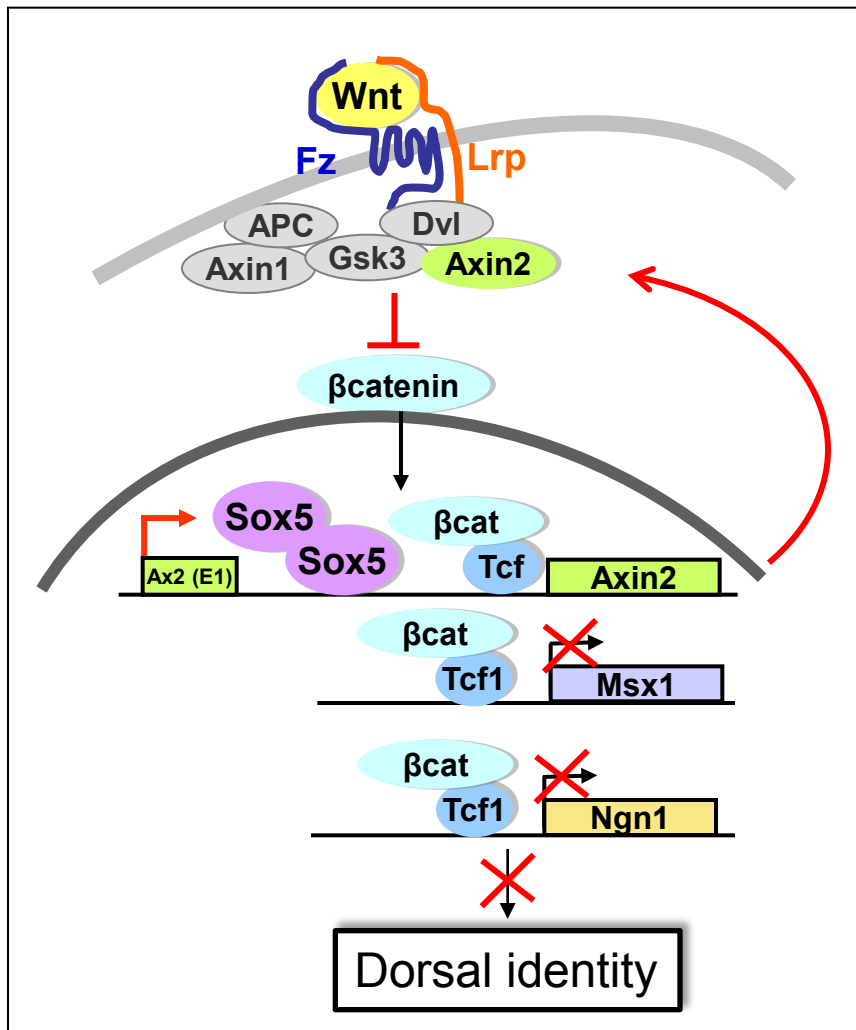


B



C





SUPPLEMENTARY MATERIAL

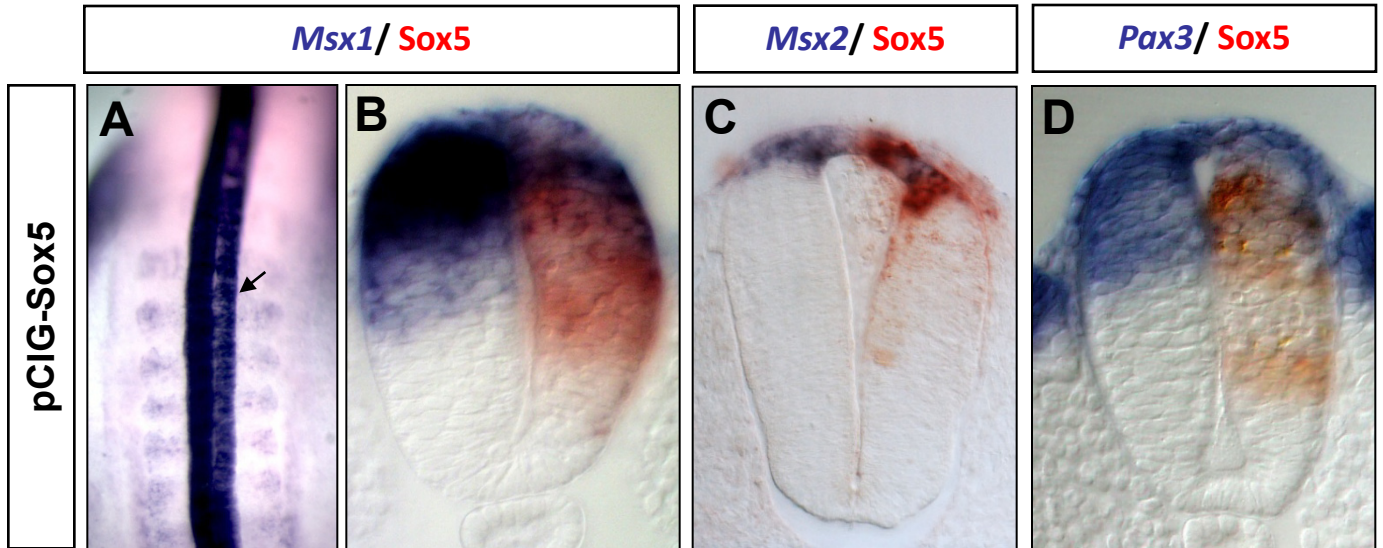
Supplementary Figure Legends

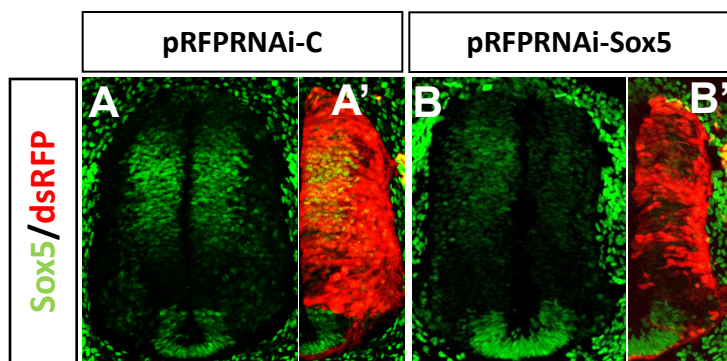
Fig. S1. Sox5 ectopic expression alters dorsal progenitor identity. pCIG-Sox5 was electroporated in HH11 chicken embryos and analyzed 24 hours PE at HH17-18 by double *in situ* hybridization in whole mount (A) and in sectioned embryos (B-D). (A) *Msx1* expression in whole embryos is reduced in the electroporated right hemitube (black arrow). (B) *Msx1* expression (blue) is dramatically reduced in the right hemitube ectopically expressing Sox5 (red). (C) *Msx2* is similarly expressed (blue) in the dorsal hemitube after Sox5 overexpression (red). (D) *Pax3* expression (blue) is severely reduced in dorsal hemitubes overexpressing Sox5 (red).

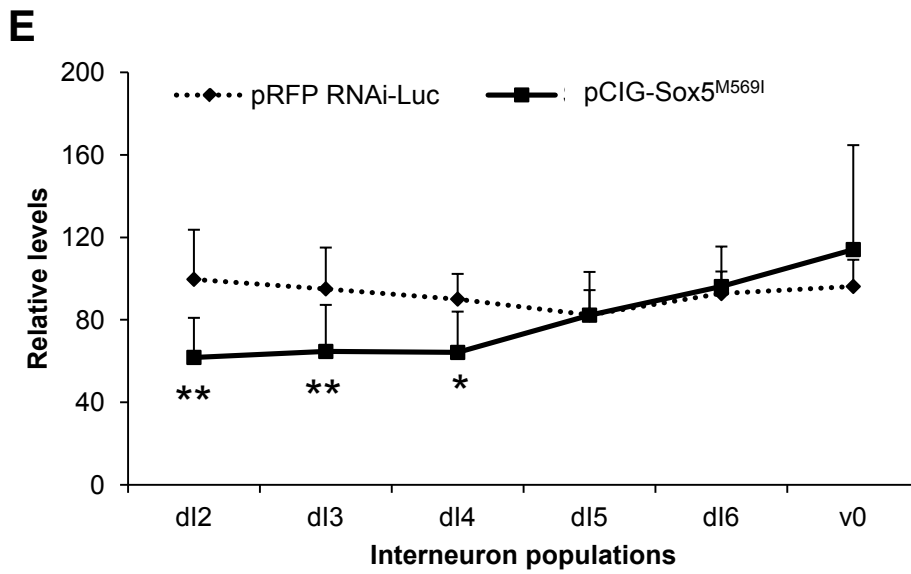
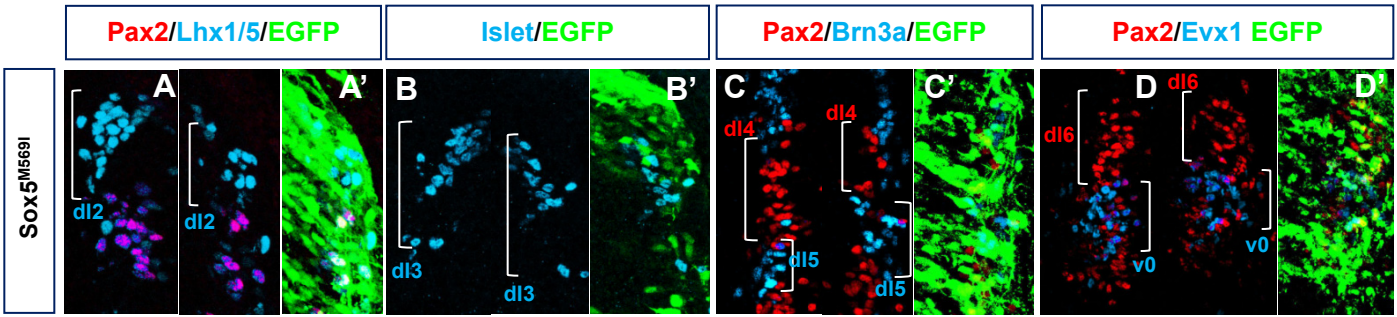
Fig. S2. pRFPRNAi-Sox5 reduces endogenous Sox5 levels. (A, B) A Sox5 specific shRNA (pRFPRNAi-Sox5) decreased the endogenous levels of Sox5 protein in relation to a pRFPRNAi-C control 48 hours PE.

Fig. 3. Sox5^{M569I} interferes with dl2, dl3 and dl4 interneuron specification. pCIG-Sox5^{M569I} was electroporated at HH14 and analyzed 48 hours PE at HH22-24 by immunohistochemistry. Panels A'-D' show the right electroporated side visualized with EGFP. (A-E') Sox5^{M569I} expression causes a decrease in dl2 (Lhx1/5⁺/Pax2⁻ cells; A, A'), dl3 (Islet 1/2⁺ cells; B, B'), dl4 (Pax2⁺/Brn3a⁻ cells; C, C') and dl5 (Brn3a⁺/Pax2⁻ cells; C, C'). Not significant changes were observed for the dl6 (Pax2⁺/Evx1⁻ cells) and v0 (Evx1⁺ cells) populations (D, D'). (E) Quantitative analysis of interneuron subpopulations in electroporated embryos represented as mean \pm SD in comparison with pRFPRNAi-C electroporated control embryos. *p<0.05, **p<0.02.

Table S1. List of the oligonucleotides used for the EMSAs described in Figure 6B and Figure S3B, the generation of mutations Sox5^{M569I} and Axin2L-T6/T13*.







SEQUENCE (5'-3')	NAME	POSITION
gggTGATTGATGG GTTTGAT GATTCTATGTC	mSox5-T9 Fwd	821-850
gggGACATAGAATC ATCAAAC CATCCCAAATCA	mSox5-T9 Rev	821-850
gggTCTTACCTGT TTCAAAG TCTCCAAAGCGGA	mSox5-T1 Fwd	1453-1482
gggTCCGCTTTTGAGAC TTTGAA ACAGGTAAGA	mSox5-T1 Rev	1453-1482
gggCCTCT CTTTGG ATTACTTTGCCCTGGGCTC	mSox5-T10 Fwd	1531-1560
gggGAGCCCAGGGCAAAGTAAT TCAAAG AGAGG	mSox5-T10 Rev	1531-1560
gggAAGGTAGGAACGT GTTTGAT TTGATGAGGG	mSox5-T11 Fwd	2416-2445
gggCCCTCATCAA ATCAAAC ACGTTCTACCTT	mSox5-T11 Rev	2416-2445
gggCTGCG CTTTGATA AGGTCCTGGCAACTCAG	mSox5-T2 Fwd	2821-2850
gggCTGAGTTGCCAGGACCT TATCAAAG CGCAG	mSox5-T2 Rev	2821-2850
gggGCTCGCGC CTTTGA AGTGCACAGTTAAATC	mSox5-T3 Fwd	3181-3210
gggGATTAACTGTGCAC TTCAAAG GCGCGAGC	mSox5-T3 Rev	3181-3210
gggTCCGCAAGGAGTGCGCCAGCGG ATCAAT GG	mSox5-T12 Fwd	3565-3594
gggCC ATTGAT CCGCTGGCGCACTCCTTGCGGA	mSox5-T12 Rev	3565-3594
gggG CTTTGAT GTGCGGGGCGGCGG CTTTGAAG	mSox5-T4/T5 Fwd	3631-3660
ggg CTTCAAAG CCGCCGCCCGCAC ATCAAAGC	mSox5-T4/T5 Rev	3631-3660
gggCCTCCT TAGTTTG ATCCTTCCCTGGCTAGG	mSox5-T13 Fwd	4574-4603
gggCCTAGCCAGGGAAGGAT CAAAC TAGGAGG	mSox5-T13 Rev	4574-4603
gggCTTTAAAGTTTGAAG ATCAAAG CCTCTAA	mSox5-T6 Fwd	4801-4830
gggTTAGAGGCTTTGATC TTCAAAC TTTTAAAG	mSox5-T6 Rev	4801-4830
gggGATTTGCGC CTTTGAAA AAGCTGCGTCGGAT	mSox5-T7 Fwd	5366-5395
gggATCCGACGCAGCTTT TTCAAAG GCGAAATC	mSox5-T7 Rev	5366-5395
gggTACTTTCTTG CTTTGAT GTTGGGTAGATC	mSox5-T8 Fwd	5463-5492
gggGATCTACCCAAC ATCAAAG CAAGAAAGTAA	mSox5-T8 Rev	5463-5492
GGTGCATCGACCCAGACC	mAxin2 T6/T13 Fwd	
CCAGTTCACTAACTTAGAGGC	mAxin2 T6/T13 Rev	
CCATGAAGTTCACCCACAGG	mAxin2 N1 Fwd	
GAGGGATGCTGAACCTGAAC	mAxin2 N1 Rev	
TCTCAGCTCTCTCGCATGCTTTGAAGAGCATGCTCTCCCCTGAG	hMutagenesis T13	7065-7109
TCTCAGCTCTCTCGCATGCTACGCGTAGCATGCTCTCCCCTGAG	hMutagenesis T6	7065-7109
CCCAATCAATGCATTCATGGT	cM569I-Fwd	1698-1718
ACCATGAATGCATTGATTGGG	M569I-Rev	1698-1718

